

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Direktor: Prof. Dr. med. P. Bartenstein

**Evaluation der humanen Natrium-Jodid-Symporter-Aktivität mittels  $^{124}\text{I}$ -PET-  
Reportergebildgebung zur hochsensitiven Überwachung der Teratombildung im  
Mausmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Georgios Kaissis

aus Baden-Baden, BRD

im Jahr 2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

Mitberichterstatter: PD Dr. Stefan Brunner, PD Dr. Clemens Cyran

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Sebastian Lehner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2015

München, im April 2015

*Gewidmet A.G.K. und C.S.-K.*

*Ohne Euch wäre all dies nicht möglich gewesen*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Definition und Arten von Stammzellen	2
1.2	Geweberegeneration mittels Stammzellen	3
1.3	Teratombildung als limitierender Faktor der Stammzelltherapie mit ESC	6
1.4	Stammzellbildung als optimale Methode des Therapiemonitorings nach Stammzelltransplantation	8
1.5	Reportergenbildung von Stammzellen	9
1.6	Funktionsweise der PET-Bildgebung	11
1.7	Ziel der vorliegenden Arbeit	13
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	Generierung und Selektion stabiler Klone in Zellkulturen	14
2.2	<i>In vitro</i> -Differenzierung	15
2.3	Immunhistologie	15
2.4	<i>In vitro</i> -Jodaufnahme ( $^{124}\text{I}$ und $^{125}\text{I}$ )	16
2.5	Mausmodell der Teratomentstehung	17
2.6	<i>In vivo</i> PET-Bildgebung	18
2.7	Auswertung der PET-Bilder	19
2.8	Histologie	20
2.9	Statistische Auswertung	20
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>21</b>
3.1	Immunhistologie	21
3.2	Klonale Selektion der ESC und Stabilität der hNIS-Expression	22
3.3	$^{124}\text{I}$ -Aufnahme <i>in vitro</i> in Zusammenhang mit der Zellzahl	23
3.4	<i>In vivo</i> - $^{124}\text{I}$ -Aufnahme und Korrelation mit der Teratommasse	24
3.5	Einfluss der Transfektion mit hNIS und der Radioaktivitätsexposition auf das Differenzierungspotential der Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	26
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>29</b>
4.1	Einleitende Bemerkungen	29
4.2	Pluripotente ESC in der klinischen Anwendung	30
4.3	<i>In vivo</i> -Monitoring der Teratomentstehung	32
4.4	Auswirkung der Transfektion und der Radioaktivität auf die ESC	35
4.5	hNIS als Reportergen für quantitative Analysen	37
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
<b>9</b>	<b>VERBINDLICHKEITEN</b>	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>64</b>

## Verzeichnis der im Text genutzten Abkürzungen

%ID: Prozentualer Anteil der injizierten Dosis

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EC: Embryonale Karzinomzellen

ESC: Embryonale Stammzelle(-n)

FDA: Food and Drug Administration

FDG: Fluor-Desoxyglucose

fLuc: Luziferase des Glühwurms

iPSC: Induzierte Pluripotente Stammzelle(-n)

MAP: maximum *a posteriori*

MRT: Magnetresonanztomographie

NIS: Natrium-Jodid-Symporter

OSEM: Ordered Subset Expectation Maximization

PET: Positronenemissionstomographie

SPECT: Einzelphotonemissionstomographie

VOI: Volume of Interest

# 1 EINLEITUNG

Trotz des rasanten medizinischen Fortschritts innerhalb der letzten Jahrzehnte existieren auch heute noch Erkrankungen, die nicht kausal therapiert werden können, weil sie durch den Verlust von Zellen nicht oder nur gering regenerationsfähiger Organe verursacht werden.

Ein Beispiel einer solchen Erkrankung ist die Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt (49). Herzerkrankungen sind die weltweit führende Todesursache (50). Da die Kardiomyozyten jedoch nur in sehr begrenztem Maße regenerationsfähig sind (57), sind die Therapiemöglichkeiten nach einer bereits stattgehabten myokardialen Schädigung bislang begrenzt. Die frühestmögliche Reperfusion der Koronarien ist somit die einzige Methode, einen irreversiblen Zellschaden zu verhindern (59). Es werden somit neue Therapieformen benötigt, die in der Lage sein werden, eine myokardiale Regeneration auch nach erfolgtem Zelltod herbeizuführen (57).

Eine weitere solche Erkrankung ist der Diabetes Mellitus (67). Epidemiologisch ist der Diabetes Mellitus die häufigste endokrine Erkrankung und eine der weltweit führenden Todesursachen (130). Pathophysiologisch liegt der Erkrankung ein Untergang der Beta-Zellen des endokrinen Pankreas zugrunde (10). Die momentan erhältlichen Behandlungsformen sind zwar kurz- und mittelfristig effektiv (17), können jedoch häufig die langfristigen erkrankungsassoziierten Komplikationen nicht verhindern (3), weswegen neuartige Behandlungsmethoden gefordert werden, um die zerstörten Beta-Zellen zu regenerieren, bzw. durch funktionsfähige zu ersetzen (67).

Auch die Therapie des ischämischen Schlaganfalls bringt die Problematik mit sich, dass das Gehirn ein terminal differenziertes Organ ist und somit der neuronale Zelltod einen irreversiblen Schaden der Hirnsubstanz darstellt (101). Wie bei der Therapie des Myokardinfarkts ist auch bei der Schlaganfalltherapie die frühestmögliche Gewebsreperfusion das Ziel, bevor ein relevanter Zellschaden eingetreten ist (123). Die Tatsache, dass der ischämische Schlaganfall die häufigste Ursache einer erworbenen Behinderung im Erwachsenenalter ist (107) belegt jedoch, dass eine Reperfusion vor dem Eintreten jeglichen Zellschadens nicht immer möglich ist. Somit wird die Notwendigkeit für Therapieansätze belegt, die einen bereits stattgefundenen Zellschaden beheben können (29).

Ein Ansatz zur Therapie solcher Erkrankungen ist der Einsatz von Stammzellen, die seit ihrer Entdeckung (15) zu diesem Zweck Gegenstand intensiver Forschung sind (49,67,29).

## 1.1 Definition und Arten von Stammzellen

Eine grundlegende Definition für den Begriff „Stammzelle“ stammt von Morrison, Shah und Anderson (99) und ist angelehnt an eine ausführliche Definition von Potten und Loeffler (117).

Stammzellen werden definiert als „undifferenzierte Zellen, die einerseits die eigene Population durch Zellteilung aufrechterhalten können (Selbsterneuerung) und andererseits differenzierte Tochterzellen bilden können (Potenz)“.

Besonders bedeutsam ist in diesem Hinblick der Begriff der „Potenz“, also das Differenzierungspotential der Stammzelle in verschiedene andere Zelltypen. Verschiedene Zelltypen sind unterschiedlich potent, und im Allgemeinen werden folgende Abstufungen unterschieden:

**Totipotente** Zellen können sich zu allen somatischen Zellen und auch zu extraembryonalen Geweben differenzieren (121). Totipotent ist beispielsweise die befruchtete Eizelle und ihre ersten, wenigen Teilungsstadien (98).

**Pluripotente** Zellen können sich zwar zu allen somatischen Zellen differenzieren, jedoch nicht zu extraembryonalem Gewebe (121). Verschiedene Zellarten sind pluripotent, zum Beispiel embryonale Stammzellen (ESC) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC).

**Multipotente** Zellen haben zwar die Möglichkeit, sich zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren, jedoch ist ihre Fähigkeit im Vergleich zu den pluripotenten Zellen wesentlich eingeschränkter (121). Im Allgemeinen beschreibt der Begriff Zellen, die ein engeres Spektrum der Differenzierungsfähigkeit besitzen als die zuvor erwähnten toti- und pluripotenten Zellen. Trotzdem sind auch sie therapeutisch relevant, beispielsweise im Rahmen der Knochenmarkstransplantation (152).

**Unipotente** Zellen sind ausschließlich in der Lage, sich zu einem einzigen anderen Zelltyp zu differenzieren (121), jedoch sind sie in der Lage, sich unbegrenzt selber zu

erneuern. Oft werden sie „Progenitorzellen“ oder im Englischen „precursor cells“ genannt (66). Solche Zellen existieren in verschiedenen Geweben, wie z.B. Muskel oder Leber, und dienen dort der Regeneration des Gewebes. Auch sie können therapeutisch eingesetzt werden, zum Beispiel zur Regeneration geschädigter Haut (137).

## 1.2 Geweberegeneration mittels Stammzellen

Eine einfache Definition der Stammzelltherapie ist „die Anwendung von Stammzellen zur Regeneration geschädigten Gewebes“ (69). Viele Arten von Zellen kommen hierfür in Frage.

**Adulte Stammzellen** finden sich physiologischer Weise in Organismen jeden Alters und können sich zum einen uneingeschränkt replizieren und zum anderen zu jedem Gewebe des Ausgangsorgans differenzieren. Sie kommen in verschiedenen Geweben (haematopoetisch, mesenchymal, neural etc.) vor. Für den therapeutischen Einsatz adulter Stammzellen ist es erforderlich, Zellen einer bestimmten Linie zu isolieren und aufzureinigen (66), jedoch geht ihre Gewinnung nicht mit der Destruktion befruchteter Eizellen bzw. Embryonen einher, da sie direkt vom Donor isoliert werden können. Somit ist ihre Gewinnung nicht mit ethischer Kontroverse behaftet.

Adulte Stammzellen werden seit längerer Zeit zur Therapie hämatologischer Erkrankungen eingesetzt (so genannte „Knochenmarkstransplantation“), wobei auto- oder allogene hämatopoetische Stammzellen aufgereinigt werden und dem Patienten nach myeloablativer Therapie verabreicht werden (152). Vorteilhaft bei der Benutzung autologer Zellen ist die fehlende Immunogenität. Die Knochenmarkstransplantation ist heutzutage die häufigste klinisch angewendete Form der Stammzelltherapie (91). Vor einigen Jahren gelang erstmals die Herstellung von Gewebe direkt aus adulten Stammzellen. Macchiarini et al. stellten im Jahr 2008 ein Trachea-Implantat aus autologen adulten Stammzellen her, das einer Patientin erfolgreich transplantiert wurde und 5 Jahre nach der Transplantation ohne immunsuppressive Therapie funktionsfähig war (60).

Den zahlreichen Vorteilen der adulten Stammzellen steht die eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit (66) gegenüber. Durch sie bedingt, muss für die Regeneration eines spezifischen Gewebes auch die geeignete adulte Stammzelle gefunden, aufge-



reinigt und transplantiert werden. Weiterhin sind ausschließlich autologe und syngene Stammzellen nicht-immunogen, während allogene Stammzelltransplantate die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie mit sich bringen (66,91).

**Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)** sind pluripotente Zellen, die sich direkt aus adulten Zellen herstellen lassen, indem spezifische Gene (z.B. Oct3/4, Sox2, c-Myc, und Klf4) in ihnen induziert werden, die sich in embryonalen Stammzellen finden. Sie wurden 2006 durch Takahashi, Yamanaka et al. erstmals aus murinen Fibroblasten generiert (146). Sie besitzen viele der Vorteile der weiter unten beschriebenen embryonalen Stammzellen, unter anderem die Differenzierungsfähigkeit zu verschiedenen Zelllinien und die unbegrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung (66,91). Da sie direkt aus adulten Zellen generiert werden, bedarf es zu ihrer Herstellung im Gegensatz zur Gewinnung von embryonalen Stammzellen keiner Manipulation bzw. Destruktion von Embryonen. Weiterhin können so aus den Zellen des Individuums selbst die entsprechenden pluripotenten Zellen generiert werden. Vorteil hierbei ist die fehlende Immunogenität (53).

Ein bei der Entdeckung der iPSC beschriebenes Problem ist die Gefahr der Tumorigenese, da das induzierte c-Myc ein Protoonkogen ist (92,108,165). In neueren Studien wurden iPSC nicht nur aus murinen Fibroblasten, sondern auch aus anderen Zellarten, beispielsweise aus adulten neuralen Stammzellen (76) und auch aus humanen Zellen (104) generiert. Hierbei wurden teilweise nicht alle durch Takahashi et al. beschriebenen Gene induziert, womit eine Tumorigenese durch die iPSC umgangen wurde (104,105). Diese Methode führte jedoch zu bedeutend geringeren Zellausbeuten (104). Auch andere Methoden zur Generierung von iPSC, wie beispielsweise mittels rekombinanter Proteine (173) oder Mikro-RNAs (7) wurden seit 2006 beschrieben, jedoch ist Nutzung von spezifischen Transkriptionsfaktoren auch in diesen Studien die Grundlage für die Zellreprogrammierung (131). Die bereits beschriebenen Problematiken der potentiellen Onkogenität sowie die Optimierung der Zellausbeute bei der Umprogrammierung sind zwei Herausforderungen, die für die ausgedehnte Anwendung von iPSC gelöst werden müssen.

Weiterhin bestehen Unklarheiten bezüglich der genomischen Stabilität der Zellen (131). So muss untersucht werden, ob durch die Reprogrammierung möglicherweise Mutationen in das Genom der Zelle eingeführt werden. Im Jahr 2010 wurden iPSC

als „ungeeignet für die klinische Anwendung“ beschrieben (131). Die erste Anwendung einer iPSC-basierten Therapie erfolgte im September 2014 an einem einzelnen Patienten (35). Bislang sind keine weiteren Therapiestudien mit iPSC am Menschen genehmigt worden.

**Embryonale Stammzellen (ESC)** entstammen dem Embryoblasten der Blastozyste und gelten als unbegrenzt regenerationsfähig und pluripotent (62). Sie wurden erstmalig im Juli 1981 durch Evans et al. aus Mäuseembryonen isoliert und beschrieben (46). Der Terminus „Embryonale Stammzelle“ wurde erstmals im Dezember desselben Jahres durch Martin et al. verwendet (46), welche die ESC aus murinen Embryonen isolierten.

Thomson et al. beschrieben 1998 zum ersten Mal eine Methode, um ESC *in vitro* zu isolieren und zu kultivieren (153). ESC sind eine intensiv erforschte Zellentität. Wirksame Methoden zur Gewinnung und Aufbereitung wurden bereits entwickelt. Viele genetische und biologische Eigenschaften der Zellen sind bereits ausführlich beschrieben (58,106,72). Die Vorteile von ESC bei der Stammzelltherapie konnten in der myokardialen Regeneration demonstriert werden: embryonale Stammzellen können sich zu allen funktionellen Herzbestandteilen differenzieren (106). Es konnte gezeigt werden, dass aus ES-Zellen entstandene Kardiomyozyten –sowohl tierische als auch menschliche- nach Implantation ins Herz im Tiermodell proliferieren (86). Weiterhin fusionieren sie teilweise mit bereits vorhandenen Kardiomyozyten (62) oder stellen elektrische Zellkontakte zu ihnen her (75,134,171). Auch wirken sie wahrscheinlich über parakrine Effekte (72) auf herzeigene Reparaturmechanismen ein.

Joggerst et al. beschrieben sie 2009 als Zellen mit „robustem regeneratischem Potential in der myokardialen Regeneration“ (72). Auch in der neurologischen Forschung sind zahlreiche positive Effekte der ESC in der Stammzelltherapie des Schlaganfalls bewiesen worden. Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass transplantierte ES-Zellen fähig sind, sich ins Hirngewebe zu integrieren (23) und die motorischen und sensorischen Hirnfunktion zu verbessern (23,37). Auch die molekularen Abläufe während der Ischämie und Reperfusion bei Schlaganfällen wurden bereits in ESC-Modellen *in vitro* untersucht (101). Somit besitzen ESC neben ihrem Potential für die Stammzelltherapie auch eine wichtige Funktion als Modellorganismen für Erkrankungen (8). 2009 wurde die erste klinische Studie mit ESC am Menschen

von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) genehmigt (97). Diese Beispiele belegen das außerordentliche Potential der embryonalen Stammzellforschung- und therapie.

Dem potentiellen Nutzen der Therapie mit ESC stehen jedoch einige Einschränkungen gegenüber. Zur Gewinnung von embryonalen Stammzellen aus Embryonen muss der Embryoblast vom Trophoblasten abgelöst werden, was zur Zerstörung des Embryos führt (153). Dies wirft komplexe ethische Fragestellungen auf (11), die die Anwendung von humanen ESC bislang stark beschränkt haben (86,119). Bis zum Jahr 2009 wurden keine Studien mit ESC am Menschen genehmigt (72).

Eine weitere Limitation stellt die Immunogenität der Stammzellen dar. ESC exprimieren, selbst wenn sie undifferenziert sind, HLA- und MHC-Antigene. Die Expression dieser Antigene verstärkt sich, je mehr sich die Zellen differenzieren (44,144). Dies kann zu Abstoßungsreaktionen bei der allogenen Transplantation von ES-Zellen führen (21). In der vorliegenden Studie wurden immuninkompetente Tiere verwendet, um solche Komplikationen zu vermeiden.

Die dritte Limitation, die bei der Benutzung von ES-Zellen auftritt, ist die Tumorentstehung durch die Zellen selbst. Bei der Transplantation von embryonalen Stammzellen in lebende Organismen wurde in zahlreichen Fällen die Bildung von Teratomen beobachtet (118). Die vorliegende Forschungsarbeit befasst sich speziell mit der Teratomentstehung als Effekt der Stammzelltransplantation.

### **1.3 Teratombildung als limitierender Faktor der Stammzelltherapie mit ESC**

Teratome sind benigne Tumore, die aus differenzierten Zellen aller Keimblätter bestehen. Wenn sie maligne Bestandteile enthalten, werden sie als Teratokarzinome bezeichnet (18). Zwischen 1960 und 1970 wurden erstmals Zellen aus Teratokarzinomen (Embryonale Karzinomzellen, EC) isoliert und in Zellkulturen vermehrt (6). Da sie pluripotent sind und sich unbegrenzt vermehren können (77), teilen sie viele der Eigenschaften von ES Zellen. Jedoch haben sie aufgrund von genetischer Instabilität ein erhebliches onkogenes Potential für die Entstehung maligner Tumore (6). So entstand die Notwendigkeit, pluripotente Zellen ohne onkogenes Potential zu isolieren.

Dies gelang, wie bereits erwähnt, Evans et al. 1981 mit der Isolation von ESC aus der inneren Zellmasse von Mäuseembryonen (46). ESC bilden keine malignen Teratokarzinome, sondern nur (benigne) Teratome (39). Die Ähnlichkeiten zwischen EC und ESC bezüglich Pluripotenz und Immortalität bildeten jedoch die Grundlage für die Entdeckung von ESC (81). Die Bildung von Teratomen durch ESC wird weiterhin als Beweis ihrer Pluripotenz angesehen (24).

Auf molekulargenetischer Basis ist die Grundlage der Teratomenstehung durch ESC noch nicht ausreichend geklärt. Mehrere hundert Gene konnten als potentielle Auslöser der Onkogenese identifiziert werden (138). Die deutlichste Assoziation zur Teratombildung scheint jedoch das Myc-Gen zu besitzen, welches–wie bereits beschrieben– in der Onkogenese durch iPSC involviert ist, jedoch auch essentiell für die Differenzierungsfähigkeit der Zellen ist. Zellen mit einer geringeren Myc-Expression bildeten experimentell weniger Teratome, waren jedoch gleichzeitig weniger differenzierungsfähig (80).

Im Kontext einer Stammzelltherapie ist die Teratomenstehung eine gefährliche Therapie Nebenwirkung, die zum Therapieversagen führen kann (83,161,54). Die Entstehung von Tumoren durch eine Stammzelltherapie ist einer der wichtigsten limitierenden Faktoren, die einer sicheren Anwendung von Stammzellen am Menschen im Wege steht (80).

Die Verabreichung hochaufgereinigter Zellsuspensionen ohne undifferenzierte Zellen scheint die wirksamste Methode zu sein, um eine Teratomenstehung zu verhindern. Es ist jedoch schwierig, absolut reine Zellsuspensionen zu erstellen (83,155). Somit ist es für die Sicherheit einer Therapiestudie von grundlegender Bedeutung, eine Teratombildung während der Therapie ausschließen zu können. Solange keine definitive Methode existiert, eine Teratombildung zu verhindern, ist es umso wichtiger, die Entstehung von Teratomen so früh wie möglich, und zwar mit hoher Sensitivität und Spezifität zu detektieren (25). Die Möglichkeit eines seriellen, nicht-invasiven Therapiemonitorings stellt somit eine der Grundvoraussetzungen der sicheren klinischen Anwendung von Stammzellen zur Therapie dar.

## 1.4 Stammzellbildung als optimale Methode des Therapiemonitorings nach Stammzelltransplantation

Ein für die Therapiekontrolle bei Stammzelltherapie besonders geeigneter Ansatz ist die Bildgebung. Sie kombiniert die Vorteile der fehlenden Invasivität und der Möglichkeit der Früherkennung von Tumoren, und ist seit langem sowohl am Menschen als auch am Tier etabliert (25). Es gibt diverse Methoden zur Visualisierung von einzelnen Stammzellen oder der Teratome, die aus ihnen entstehen.

Die **Magnetresonanztomographie (MRT)** wurde als eine der ersten Methoden zur Visualisierung transplantierte Stammzellen verwendet (68). Sie basiert auf der Anregung und Relaxation von Wasserstoffprotonen mittels starker Magnetfelder, um Unterschiede in der Protonendichte der Gewebe darzustellen. Ihre Vorteile sind eine hohe örtliche Auflösung, insbesondere bei der Darstellung von Weichteilen, sowie die fehlende Strahlenbelastung (63). Um eine verbesserte Visualisierung und einen höheren Kontrast zwischen den injizierten Zellen und dem umgebenden Gewebe zu erzielen, werden die Zellen in den meisten Fällen vor der Injektion mit spezifischen Substanzen markiert. Diese Methode der Zellmarkierung nennt sich „Cell labeling“ (von engl. „label“: „Beschriftung, Etikett“) (9). Die am häufigsten verwendeten Substanzen sind Gadoliniumverbindungen, fluoridierte Nanopartikel sowie Eisenoxidpartikel (22). Insbesondere die Bildgebung mit Eisenoxidpartikeln, welche durch nicht-phagozytäre Zellen internalisiert werden, welche dann einen höheren Kontrast im MRT aufweisen (95) ist sehr vielversprechend. Einige Eisenoxidpartikel-Formulierungen wurden bereits für die klinische Anwendung zugelassen (162), womit eine translationale Anwendung der MRT-Stammzellbildung ermöglicht wird.

Auch mittels **optischer Visualisierungstechniken** (Biolumineszenz, Fluoreszenz) kann eine Visualisierung von Stammzellen erfolgen (68). Diese basieren auf einer Transfektion der Zellen mit Proteinen wie der Glühwurmluziferase (fLuc) oder dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) (68), bzw. auf einer Markierung der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen vor der Injektion (47). Vorteile der optischen Methoden sind die einfache Durchführbarkeit, die geringen Kosten, sowie die hohe Sensitivität. Aufgrund jedoch der Tatsache, dass Licht beim Durchtritt durch Gewebe abgeschwächt wird, sind diese Methoden vor allem auf Kleintiermodelle beschränkt (68). Auch die Tatsache, dass die Zellen genetisch manipuliert werden müssen, und somit

potentiell ein anderes Differenzierungsverhalten oder Überleben aufweisen, stellt eine Limitation der Methode dar (71). Die beschriebenen optischen Methoden stellen trotzdem, vor allem in Kombination mit anderen Modalitäten, eine wichtige Visualisierungsmethode dar (166). Sie wurden bereits für die Darstellung von sowohl kardialen als auch neuronalen ESC angewendet (20,100) und ein fluoreszierender Farbstoff (Indozyanin grün) ist bereits für die klinische Anwendung zugelassen, und für die Markierung von ESC geprüft (19).

Die **Visualisierung von Stammzellen mittels Radionukliden** kann mittels zwei unterschiedlicher Verfahren erfolgen. Der Vorteil beider Methoden liegt in ihrer hohen Sensitivität und dem großen Potential für translationale Anwendung (132): Es besteht einerseits die Möglichkeit, Zellen direkt mit einem Radionuklid, wie beispielsweise  $^{111}\text{In}$  (110) oder  $^{18}\text{F}$  (87) zu markieren, wobei die Verwendung von  $^{111}\text{In}$  zur extrakorporalen Zellmarkierung auch am Menschen zugelassen ist (68). Alternativ können auch Gene in das Zellgenom eingeführt werden, welche die Expression von Proteinen kodieren, die spezifisch mit einem Radionuklid interagieren („Reporterogenbildung“). In beiden Fällen können die Zellen dann mittels Einzelphotonemissionstomographie (SPECT) oder Positronenemissionstomographie (PET) visualisiert werden.

Durch die Kombination von Visualisierungsmethoden („**multimodale Bildgebung**“ oder „**Hybridbildgebung**“) können die Vorteile von unterschiedlichen Verfahren verbunden werden. Beispielsweise wurden durch Daadi et al. Biolumineszenz und MRT verknüpft, um eine anatomisch hochauflösende sowie hochsensitive und -spezifische Bildgebung zu ermöglichen (36).

Die vorliegende Forschungsarbeit basiert auf der Reporterogenbildung, die an dieser Stelle beschrieben wird.

## **1.5 Reporterogenbildung von Stammzellen**

Basierend auf einer Definition von Kang und Chung (74) formulierten Mathiasen und Kastrup im Jahr 2013 (95), folgende Erklärung für das Konzept der Reporterbildung:

„Reportergene sind DNA-Sequenzen, die in das Genom der interessierenden Zelle eingefügt werden. Sie kodieren Reporterproteine, die über spezifische Bindungen Komplexe mit ausgewählten Radiotracern bilden, die dann mittels PET, SPECT oder MRT visualisiert werden können.“

Ein großer Vorteil der Anwendung von Reportergenen ist die Tatsache, dass sie stabil in das Genom der Zelle integriert sind, und somit während des gesamten Lebens der Zelle exprimiert werden, und auch an Tochtergenerationen weitergegeben werden. Weiterhin kann problemlos zwischen vitalen und avitalen Zellen unterschieden werden, da die Expression des Genproduktes nur durch vitale Zellen erfolgt (95,151,154,56).

Die erste Studie zur Reportergenbildung von ESC wurde 2006 von Cao et al. durchgeführt, die mittels eines viralen Vektors fLuc sowie eine mutierte virale Thymidinkinase (HSV1-sr39tk) in das Genom von ESC einfügten (25). Die Zellen konnten somit sowohl mittels *in vivo*-Fluoreszenz als auch mittels  $^{18}\text{F}$ -FHBG-PET visualisiert werden.

Außer dem beschriebenen Thymidinkinasegen kommen auch weitere Gene zur Verwendung. Sie kodieren beispielsweise den Dopamin-2-Rezeptor (87) oder den Östrogenrezeptor (55). Die Grundlage der vorliegenden Forschungsarbeit bildet die Benutzung des Natrium-Jodid-Symporter (NIS)-Gens als Reportergen.

Das NIS-Gen kodiert für ein membranständiges Protein, dass in Schilddrüsen-, Magen- und Speicheldrüsenzellen exprimiert wird (43). Es besitzt dreizehn transmembranale Domänen. Seine Funktion liegt im Kotransport von zwei Natriumionen und einem Jodidion ins Zellinnere. Die treibende Kraft hierfür ist der transmembranale Natriumgradient, der über die Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten wird (38,135). Das NIS-Gen der Ratte wurde 1996 durch Dai et al entdeckt und 1996 wurde durch Smanik et al. das humane NIS-Gen beschrieben (38,135).

Außer Jodid transportiert der NIS auch andere Kationen wie Perchlorat ( $\text{ClO}_4^-$ ) oder  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat und reichert diese im Zellinneren an (157).

Diese Tatsachen machen NIS zu einem sehr nützlichen Reportergen. Dadurch, dass NIS nur in 3 Geweben exprimiert wird, kommt ein starker Kontrast zwischen NIS-

exprimierenden transfizierten Zellen und dem umgebenden Gewebe zustande. Weiterhin sind die Substrate von NIS, Jodid und  $^{99m}\text{Tc}$ -Pertechnetat im Allgemeinen kostengünstig und einfach erhältlich. Sie sind am Menschen seit langem etabliert und ihre Kinetik und ihr Abbau sind weitestgehend verstanden, da sie seit Jahren für die Diagnostik in klinisch-nuklearmedizinischen Abteilungen genutzt werden (32). Ebenfalls besteht die Möglichkeit, durch die geeignete Auswahl des Radionuklids, sowohl SPECT- als auch PET- Untersuchungen mit denselben Zellen durchzuführen.

## **1.6 Funktionsweise der PET-Bildgebung**

Die Positronenemissionstomographie (PET) ist ein funktionell-molekulares Schnittbildgebungsverfahren bei dem die metabolische Aktivität von Geweben oder das Vorhandensein spezifischer Zellstrukturen in ihnen durch die Messung der Verteilung eines Radionuklids zur Darstellung kommt (40). Die physikalische Grundlage der PET ist der Zerfall eines beta(+)-strahlenden Nuklids, wobei Gammastrahlung entsteht, die durch Detektoren aufgenommen wird (142). Das Konzept der Positronenemissionstomographie wurde erstmals im Jahr 1975 durch Ter-Pogossian, Phelps, et al. beschrieben (148,112).

Ein PET-System besteht im Wesentlichen aus einer Reihe von Gammadetektoren, die ringförmig um den Patienten angeordnet sind. Diese sind mit einem Computersystem verbunden, welches die auf die Detektoren auftreffenden Signale zu einem Datensatz verrechnen kann (142). PET-Systeme werden heutzutage fast ausschließlich in Kombination mit CT- oder MRT-Systemen genutzt. Die Kombination der hohen räumlichen Auflösung dieser Systeme und der Möglichkeit, durch die PET-Bildgebung Aussagen über die metabolische Aktivität der Gewebe zu machen, führt zur einer höheren diagnostischen Wertigkeit der Untersuchung (156).

Für die PET-Bildgebung werden beta(+)-strahlende Nuklide wie  $^{18}\text{F}$  oder  $^{124}\text{I}$  angewendet, die sich in geeigneten Zielgeweben anreichern (142). Sie haben die Eigenschaft, während ihres Zerfalls Positronen freizusetzen. Positronen sind Elementarteilchen die bis auf die elektrische Ladung und das magnetische Dipolmoment zu Elektronen identisch sind (5). Da ihre Ladung vom Betrag her gleich ist, jedoch das entgegengesetzte Vorzeichen hat als die Ladung eines Elektrons, werden Positronen und Elektronen als „Antiteilchen“ bezeichnet (5,42).



Wenn ein Positron auf ein Elektron trifft, kommt es zur Paarvernichtung beider Teilchen. Dabei werden zwei Gammaphotonen mit einer Energie von je exakt 511 keV freigesetzt, die sich auf Bahnen, deren Winkel annähernd  $180^\circ$  beträgt, in entgegengesetzte Richtungen bewegen (40). Wenn diese Photonen in einem zeitlich definierten Abstand auf die Detektoren des PET-Systems auftreffen, so wird diese so genannte „Koinzidenz“ als Signal entlang der Flugbahn der Photonen registriert. Auf diese Art wird, über die Akquisition vieler solcher Koinzidenzen, sowie über deren örtliche und zeitliche Verteilung, ein PET-Datensatz generiert, aus dem dann von Menschen beurteilbare Bilder errechnet werden können (40,116).

Für die Berechnung von sinnvoll verwendbaren Bildern müssen die Messdaten in einem ersten Schritt korrigiert werden. Die wichtigsten Einflüsse auf die Qualität des Datensatzes haben hierbei Schwächungsphänomene, Streuung, Zufallskoinzidenzen an den Detektoren, Totzeit sowie die Minderung der Aktivität des Nuklids durch den eigenen Zerfall (120). Zum Ausgleich dieser Störfaktoren werden Korrekturalgorithmen verwendet (Schwächungskorrektur, Scatterkorrektur, Zerfallskorrektur etc.).

Im zweiten Schritt folgt eine Rekonstruktion der Daten zu Schnittbildern. Hierfür kommen spezifische Rekonstruktionsalgorithmen zum Einsatz. In der Vergangenheit wurde häufig die sogenannte „gefilterte Rückprojektion“ (Filtered Back Projection) angewendet. Diese wurde jedoch inzwischen vollständig durch iterative Rekonstruktionsalgorithmen wie OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization) und MAP (Maximum A Posteriori) ersetzt, da diese eine bedeutend bessere Bildqualität und Auflösung bei geringerer Strahlenbelastung und kürzeren Messzeiten bieten können (122,160).

Die Auflösung moderner PET-Systeme liegt im Bereich von wenigen Millimetern (40,14) und die Nachweisgrenze von Kleintier-PET-Systemen im optimalen Fall bei ca.  $10^5$  Zellen (48). Weiterhin besteht die Möglichkeit einer absoluten Quantifizierung der Radioaktivität in einem untersuchten Bereich, wodurch genaue Berechnungen zur Funktion der Gewebe ermöglicht werden (145). Die hohe Sensitivität und Auflösung, sowie die Möglichkeit von Quantifizierung und Berechnungen sind für die vorliegende Forschungsarbeit von grundlegender Bedeutung.

## 1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im *in vitro*-Teil der Studie wurden 3 Ziele verfolgt: Die Herstellung eines stabil NIS-transfizierten ESC-Klons, die Überprüfung der mittelfristigen Differenzierungsfähigkeit der ESC nach der Transfektion und die Untersuchung der Abhängigkeit der aufgenommenen Aktivität der Zellsuspensionen von der Zellzahl.

Im *in vivo*-Teil der Studie wurden serielle PET-Untersuchungen der Teratome durchgeführt, um die Sensitivität und Spezifität des Reportergens, insbesondere auch bei geringen Zellzahlen und über die Zeitspanne von mehreren Wochen hinweg zu untersuchen. Weiterhin wurde eine Quantifizierung der Radionuklidaufnahme durchgeführt, und es wurde überprüft, ob diese mit der Masse der Teratome korreliert.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Generierung und Selektion stabiler Klone in Zellkulturen

Erstes Ziel der Studie war die Erstellung stabil mit dem NIS-Gen transfizierter, transgener ESC. Diese werden im Weiteren als NIS+ Zellen bezeichnet.

Die Transfektion erfolgte mittels Subklonierung der humanen NIS-cDNA (Imagenes, Berlin) zwischen die Loci Hind III und Xba I des Vektors pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen Corp., USA). So entstand ein Plasmid, welches nach Amplifikation in die murine ESC-Linie GSES (102,41) mittels Elektroporation eingeführt wurde.

Die Elektroporation erfolgte in Übereinstimmung mit den Standardprotokollen von Müller et al. (102,41) mit folgenden geringen Modifikationen nach David et al. (41): 5 µg (statt bei Müller et al. 10 µg) nicht-linearen Vektors wurden bei 240 V und 500 µF in  $5 \times 10^6$  GSES-Zellen (statt bei Müller et al.  $2.5 \times 10^7$  Zellen) elektroporiert. Daraufhin wurden die transfizierten Zellen durch Hygromycinexposition selektiert.

Die so entstandenen transgenen Zellen wurden, entsprechend der von David et al. beschriebenen Methodik (41), in hoch glukosehaltigem Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) vermehrt, dem 10% hitzeinaktiviertes, für die Anwendung an ESC zugelassenes fetales Kälberserum, 2mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 0,25 mg/ml Hygromycin (alle Reagenzien GIBCO BRL, Deutschland) sowie 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma, Deutschland) hinzugefügt wurden.

Die Zellen wurden unter nährstofffreien Bedingungen und unter Zugabe von 1000 U/ml aufgereinigtem murinem Leukämie-inhibierendem Faktor (ESGRO; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) zur Verhinderung der Differenzierung bei 37° C in feuchter Umgebung mit 5% CO<sub>2</sub>/ 95% O<sub>2</sub> gehalten. Einzelschichten wurden bei einer Konfluenz von 70-80% trypsinisiert.

Nachdem über zwei Wochen der Selektionsdruck mittels Hygromycin aufrecht erhalten wurde, wurden Einzelkolonien ausgewählt und ausgedünnt, um Klone zu erhalten. Die so entstandenen achtzehn Klone wurden auf die Effizienz der Traceraufnahme *in vitro* geprüft. Die Klone, welche die höchsten Aufnahmewerte zeigten, wurden für die weiteren Experimente ausgewählt (Abb. 1).

## 2.2 *In vitro*-Differenzierung

Die *in vitro*-Differenzierung erfolgte zur Prüfung der Differenzierungsfähigkeit der Zellen nach NIS-Transfektion. Hierzu wurden, entsprechend der von David et al. beschriebenen Methodik (41), GSES-Zellen mittels 0,25% Trypsin-EDTA abgelöst und die Suspension in Bakteriologie-Schalen bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Schale überführt. Dort wurden die Zellen in ISCOVE's modifiziertem Eagle Medium (Sigma), supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 2mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1x nichtessentiellen Aminosäuren (alle Reagenzien Life Technologies, Inc.) sowie 450 µM  $\alpha$ -Monothioglycerol (Sigma) gehalten. Das Medium wurde täglich gewechselt. Es kam kein Hygromycin zum Einsatz, um die selektionsdruckunabhängige Stabilität der NIS-Expression zu prüfen.

Nach zwei Tagen entstanden „Embryoid Bodies“ (dreidimensionale Aggregate von ESC oder anderen pluripotenten Zellen, die sich im Prozess der Differenzierung zu allen drei Keimblättern befinden (85)), welche in frisches Medium übertragen wurden. An Tag 6 wurden dann „Embryoid Bodies“ ähnlicher Größe auf gelatineüberzogene Gewebekulturschalen ausplattiert.

## 2.3 Immunhistologie

Zellen wurden in 4%-igem PFA für eine Stunde bei 4°C fixiert, dann mittels 0,1%-igem Triton-X (Sigma) permeabilisiert und mit 0,2% Kaltwasser-Fischgelatine (Sigma) in 10% FCS (Gibco) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte ebenfalls in Blockadelösung unter Zugabe von 0,01%-igem Saponin (Sigma). Als primärer Antikörper diente ein muriner anti-hNIS monoklonaler Antikörper gegen Aminosäurereste 468-643 des hNIS. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Zimmertemperatur.

Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Kaninchen-PE-Antikörper (präabsorbierter, phycoerythrinconjuguierter Antikörper), der über 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert wurde.

Die Proben wurden mittels Dako mounting Medium (DAKO) auf Objektträger aufgebracht, und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet und fotografiert (Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop). Für die Mikroskopie wurde das von Spitzweg et al. beschriebene Protokoll angewandt (139).

## **2.4 *In vitro*-Jodaufnahme ( $^{124}\text{I}$ und $^{125}\text{I}$ )**

Für die Messung der *in vitro*-Aufnahme von Jodisotopen finden sich unterschiedliche Protokolle (128,141,163). Das in der vorliegenden Forschungsarbeit angewandte Verfahren orientiert sich am Protokoll von Scholz et al. (128). Alle Messungen wurden, wie dort beschrieben, unter „steady-state-Bedingungen“ durchgeführt (37°C).

Die Überprüfung der *in vitro*-Aufnahme erfolgte in NIS+ GSES-Zellen, mit und ohne Zusatz von Perchlorat zur Blockierung der Jodaufnahme (33) .

Die Zellen wurden auf 12-Well-Platten kultiviert und bei 75%-iger Konfluenz für die Experimente verwendet. Für jedes der Isotope wurde eine Platte verwendet und pro Zellzahl ( $5 \times 10^5$ ,  $10 \times 10^5$  und  $15 \times 10^5$ ) waren zwei Wells pro Platte besetzt. Zwei weitere Wells auf jeder Platte waren mit den für die Kontrolle durch Perchlorat vorgesehenen Zellen in einer Zahl von  $10 \times 10^5$  Zellen besetzt. Auf diese Weise konnten pro Isotop und Zellzahl zwei Datenpunkte generiert werden (4 Datenpunkte insgesamt; Abb. 2).

Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in einer „laminar-flow-bench“ durchgeführt.

Das Jodisotop lag in Form von  $\text{Na}^{124}\text{I}$  oder  $\text{Na}^{125}\text{I}$  vor. Hiervon wurden 3,7 kBq mit 10  $\mu\text{M}$  sowie 10mM HEPES gemischt, und die Lösung auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt, wie in (163) beschrieben.

Zu den Zellen der Kontrollgruppe wurde vor Beginn der Experimente 100 $\mu\text{M}$  Kaliumperchlorat hinzugefügt und für 15 Minuten inkubiert.

Sodann wurde allen Wells die radioaktive Jodlösung hinzugefügt und die Platten für 45 Minuten bei 37° C inkubiert.

Nach 45 Minuten wurden alle Wells mit HBSS-gepufferter HEPES-Lösung (pH 7,3) gespült und die Zellen zur Freisetzung des intrazellulären Jods mittels 1mM NaOH für 20 Minuten lysiert. Die Zelllysate wurden daraufhin in Gammacounter-Röhrchen überführt und in einem Beckmann 9000 Gammacounter (Beckmann Instruments, Palo Alto, CA) gemessen.

Die Experimente wurden an Tag 4 sowie an Tag 28 auf identische Art und Weise durchgeführt. Da die Zellen, wie oben beschrieben, nach der ersten Selektion in hygromycinfreiem Medium gehalten wurden, diente dieser Schritt zur Feststellung der selektionsdruckunabhängigen Stabilität der NIS-Expression über 28 Tage.

Die Ergebnisse der Gammacounter-Messung wurden über die Zeit hinweg (Abb. 3) sowie in Zusammenhang mit der Zellzahl graphisch dargestellt und betrachtet (Abb. 3).

## **2.5 Mausmodell der Teratomentstehung**

Alle Tierexperimente wurden durch die Ethikkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt, und wurden entsprechend der Vorgaben des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des US National Institute of Health (NIH Publikation No. 85-23 in der Fassung von 1996) durchgeführt.

Neun immundefiziente NOD-SCID-Mäuse (Firma Charles River, Sulzbach) mit Körpermassen zwischen 18 und 25 g wurden für die subkutane Implantation der murinen ESC verwendet.

Für die Generierung der Teratome wurde eine Suspension aus  $10^5$  NIS+ GSES-Zellen, suspendiert in 300-500  $\mu$ l 0,9%-iger NaCl-Lösung zubereitet. Diese wurde dann mittels einer 29G-Kanüle in die Subkutis über beiden Hinterläufen von sieben der Mäuse injiziert. Vor der Injektion wurden die Tiere in einer Isoflurankammer (2,5% Isofluran in 97,5% O<sub>2</sub>) narkotisiert.

Die anderen zwei Mäuse erhielten die oben beschriebene Suspension, jedoch mit  $10^5$  NIS-negativen GSES-Zellen. Diese Tiere werden im Weiteren auch als „Kontrolltiere“ bezeichnet.

Die Tiere wurden dann unter tierärztlicher Beobachtung gehalten, und eine Teratombildung abgewartet. Zur Kontrolle der Teratomentstehung wurden die Injektionsstellen täglich palpiert, um eine Teratombildung festzustellen.

Auf diese Weise bildeten sich über einen Zeitraum von zwei Wochen insgesamt 14 NIS+ Teratome sowie 4 NIS-negative Teratome.

## **2.6 *In vivo* PET-Bildgebung**

Die Bildgebung der Tiere erfolgte in einem dedizierten Kleintier-PET-Scanner (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthcare Molecular Imaging, Knoxville, TN, USA). Als Radiotracer diente  $^{124}\text{I}$ .

Die PET-Untersuchungen erfolgten wöchentlich zwischen Tag 14 und Tag 42 (Tage 14, 21, 28, 35 und 42).

Vor Beginn jeder Messung wurden die Tiere in einer Isoflurankammer (2,5% Isofluran in 97,5%  $\text{O}_2$ ) narkotisiert, und die Narkose dann während der Messung mittels einer Gesichtsmaske aufrechterhalten (1,5% Isofluran in 98,5%  $\text{O}_2$  bei einer Flussrate von 1,2 l/min).

Zur Applikation des Radiotracers wurde ein Katheter in die Schwanzvene der Tiere eingeführt und 10-15 MBq  $^{124}\text{I}$  (als  $\text{Na}^{124}\text{I}$ -Lösung in 100  $\mu\text{l}$  NaCl 0,9%) injiziert.

45 Minuten nach der intravenösen Injektion des Radiotracers wurde eine 30-minütige PET-Akquisition der Tiere durchgeführt, gefolgt von einer 15-minütigen Transmissionsmessung mittels rotierender  $^{57}\text{Co}$ -Punktquelle.

An jedem der Messtage (Tage 14, 21, 28, 35 und 42) wurde ein Tier mittels zervikaler Dislokation in Narkose getötet, die Teratome (n=2) herauspräpariert, mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gespült und in 4%-iger Formaldehydlösung bei 4°C für 24 Stunden fixiert. Daraufhin wurden die Präparate in 70%-igem Ethanol für die weitere histologische Untersuchung aufbewahrt.

Die restlichen Tiere wurden zurück in ihre Käfige gelegt, wo sie sich unter tierärztlicher Aufsicht erholten.

An Tag 14 wurde außerdem eine weitere PET-Untersuchung zur Überprüfung der Spezifität der *in vivo* Jodaufnahme durchgeführt. Hierbei wurden die Tiere, denen NIS-negative Zellen injiziert wurden (n=2), sowie ein Tier, dem NIS+ Zellen injiziert wurden, und ein weiteres Tier, dem NIS+ Zellen injiziert wurden, und dem zusätzlich 30 Minuten vor der Messung 2 mg Perchlorat zur Blockade der Jodaufnahme intraperitoneal injiziert wurden (78), untersucht. Die PET-Untersuchungen wurden dann, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Die Datensätze der PET-Untersuchungen wurden mithilfe der Software „Inveon Acquisition Workplace“ (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) rekonstruiert. Alle Datensätze wurden als statische Bilder rekonstruiert. Für die Rekonstruktion kam der OSEM3D-Algorithmus mit 4 Iterationen, in Kombination mit dem MAP-Algorithmus mit 32 Iterationen in einer Matrix von 256 x 256 Pixeln bei einem Zoomfaktor von 100% und einem  $\beta$ -Wert von 0,15 zur Anwendung. Es ergaben sich somit 159 Schichten mit einer Schichtdicke von je 0,796 mm. Alle Datensätze wurden außerdem normalisiert, auf das Vorliegen von Zufallskoinzidenzen, von Totzeit sowie von Schwächung und Streuung korrigiert.

## 2.7 Auswertung der PET-Bilder

Die PET-Bilder wurden mithilfe der Software „Inveon Research Workplace“ (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) ausgewertet. Ein Volume of Interest (VOI) wurde um das gesamte Tier gezeichnet, um die gesamte applizierte Aktivität des  $^{124}\text{I}$  zu erhalten ( $D_I$ ). Ein weiteres VOI wurde um das Teratom gezeichnet, um die Aktivität im Tumor zu erhalten ( $D_T$ ). Alle VOIs wurden mittels der Threshold-Technik generiert (von engl. Threshold: Schwelle, Grenze). Hierbei wurde die Obergrenze bei 100% der Aktivität gesetzt, und die Untergrenze so gewählt, dass das Volumen des VOI (in  $\mu\text{l}$ ) der Masse des Tieres bzw. des Teratoms (in g) entspricht. Die korrekte Lage der VOIs wurde in allen 3 Ebenen überprüft und die prozentuale injizierte Dosis (%ID) wurde mittels folgender Formel errechnet:

$$\%ID = \frac{D_T}{D_I} \times 100$$



Als %ID wird im Weiteren der Prozentteil der gesamten injizierten Aktivität, die sich im Tumor anreichert, bezeichnet.

## **2.8 Histologie**

Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, wurden die Teratome präpariert, gespült, in Formaldehyd fixiert und in Ethanol aufbewahrt. Daraufhin wurden sie in 2mm-Schichten geschnitten, prozessiert und paraffineingebettet. Die Paraffinblöcke wurden letztlich in 4- $\mu$ m-Schichten mikrotomiert, auf Objektträger aufgebracht, und die Schnitte mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung angefärbt. Zur Überprüfung der Differenzierung der Zellen in alle 3 Keimblätter wurden die Schichten dann mikroskopisch betrachtet und bei 400-facher Vergrößerung digital fotografiert.

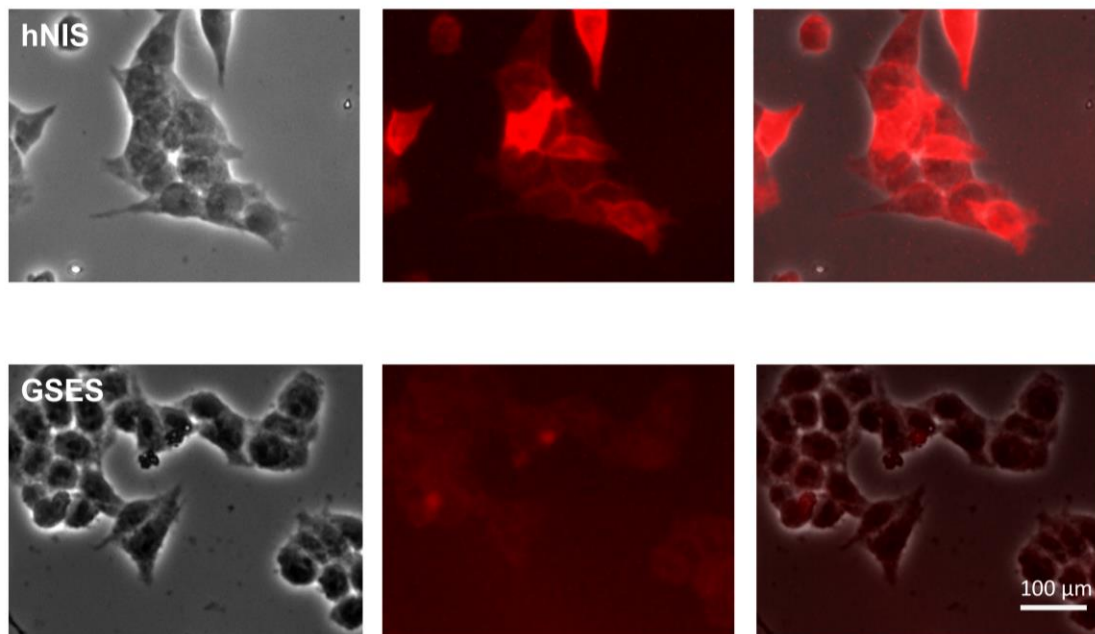
## **2.9 Statistische Auswertung**

Alle kontinuierlichen Variablen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für Gruppenvergleiche wurde eine einfache Varianzanalyse („one-way-ANOVA“) durchgeführt. Unterschiede zwischen Gruppen wurden mittels der Bonferroni-Methode analysiert. Für Korrelationen zwischen Variablen wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und die r-Werte nach Pearson angegeben. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistische Signifikanzgrenze festgelegt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Immunhistologie

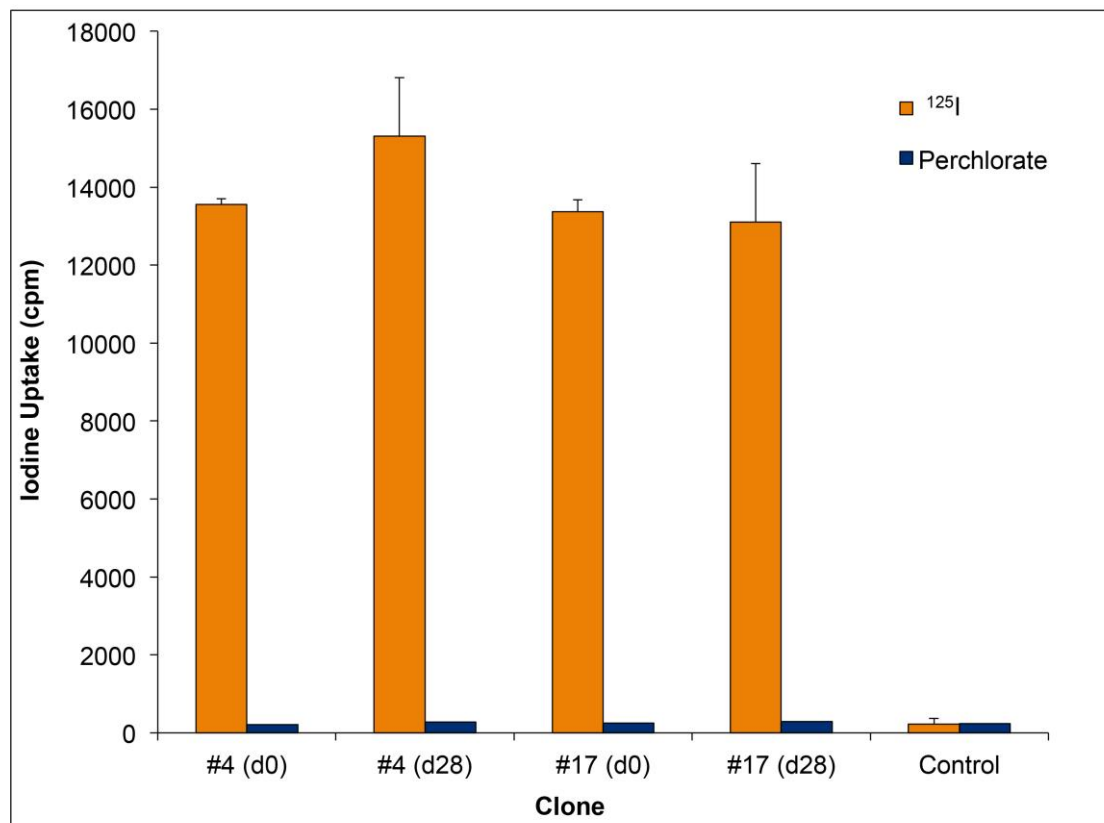
Der primäre Erfolg der Transfektion wurde nach Hygromycinselektion durch die Anfärbung der transfizierten ESC mittels murinem monoklonalem Antikörper bestätigt (Abb. 1).



**Abbildung 1.: Bestätigung der ektopen NIS-Expression mittels Immunhistologie.** Repräsentative Fotografien der mikroskopischen Ansicht von Kolonien des NIS+ Klons 17 nach klonaler Selektion wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Oben: Expression des transgenen hNIS in stabil transfizierten murinen ESC. Unten: Fehlende Expression in Kontrollzellen. Von links nach rechts: Hellfeldmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Überlagerung der beiden Bilder.

### 3.2 Klonale Selektion der ESC und Stabilität der hNIS-Expression

Zur Selektion der Klone mit der ausgeprägtesten und stabilsten hNIS-Expression (entspricht der effizientesten  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme) wurde die funktionelle *in vivo*-Aktivität des transfizierten hNIS sowie seine Spezifität *in vitro* überprüft. Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, wurden sowohl die transfizierten NIS+ ESC als auch die nichttransfizierten NIS-negativen ESC (jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen) mit  $^{125}\text{I}$  inkubiert, das zur Akkumulation einer relevanten Aktivitätsmenge  $^{125}\text{I}$  in den NIS+ ESC führte. Die NIS-spezifische Blockade mittels Perchlorat (33) verringerte die Aufnahmemenge der transfizierten NIS+ ESC auf das Niveau der nichttransfizierten Kontrollzellen. Die Effizienz der Jodaufnahme blieb auch ohne Hygromycinzusatz über 28 Tage stabil (Abb. 2).

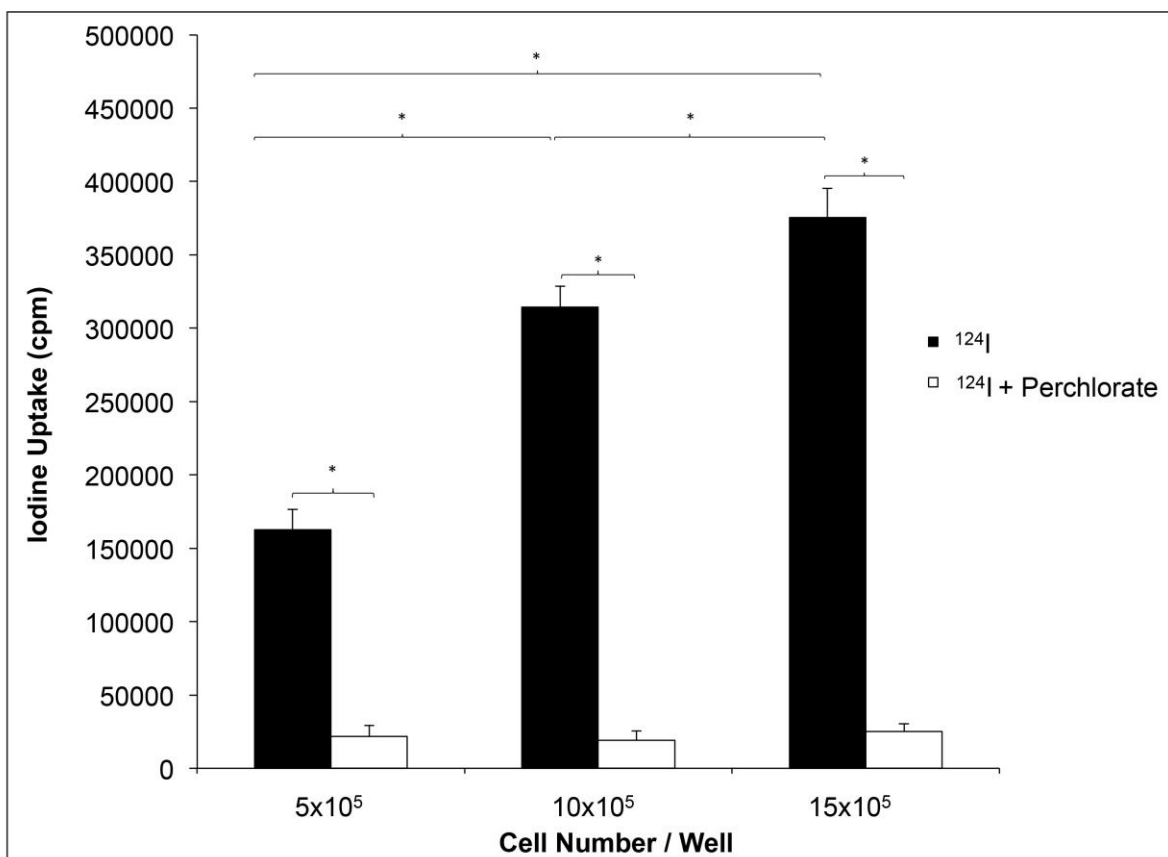


**Abbildung 2:  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme in transgene Zellen.** hNIS-transfizierte Zellen (Klone 4 und 17) zeigen eine hohe und spezifische  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme über 28 Tage. Blockade mit Perchlorat führt zu einer Reduktion der Jodaufnahme auf das Niveau von nicht-transfizierten Zellen. Beachtenswert ist, dass die hNIS-Expression *in vitro* auch ohne Hygromycinselektion weiterbesteht. Die antibiotikaunabhängige transgene Expression ist eine Voraussetzung für die Nachverfolgung der Zellen im Tiermodell.

Jede Säule entspricht zwei Wells der 12-Well Platte, die separat in jedem von zwei identischen Experimenten gemessen wurden (4 Messpunkte pro Säule).

### 3.3 $^{124}\text{I}$ -Aufnahme *in vitro* in Zusammenhang mit der Zellzahl

Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, erfolgte eine Messung der zellgebundenen  $^{124}\text{I}$ -Aktivität und eine Prüfung ihres Zusammenhangs zur Zellzahl. Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang der Zellzahlen ( $5 \times 10^5$ ,  $10 \times 10^5$  und  $15 \times 10^5$ ) und der Jodaufnahme. Wie bereits beschrieben, konnte auch hier die Jodaufnahme mittels Perchloratvorbehandlung blockiert werden, was wiederum die hohe Spezifität der Aufnahme beweist. Die zellgebundene Aktivität unterschied sich signifikant zwischen blockierten und nichtblockierten Zellen ( $p < 0,05$ , Abb. 3).

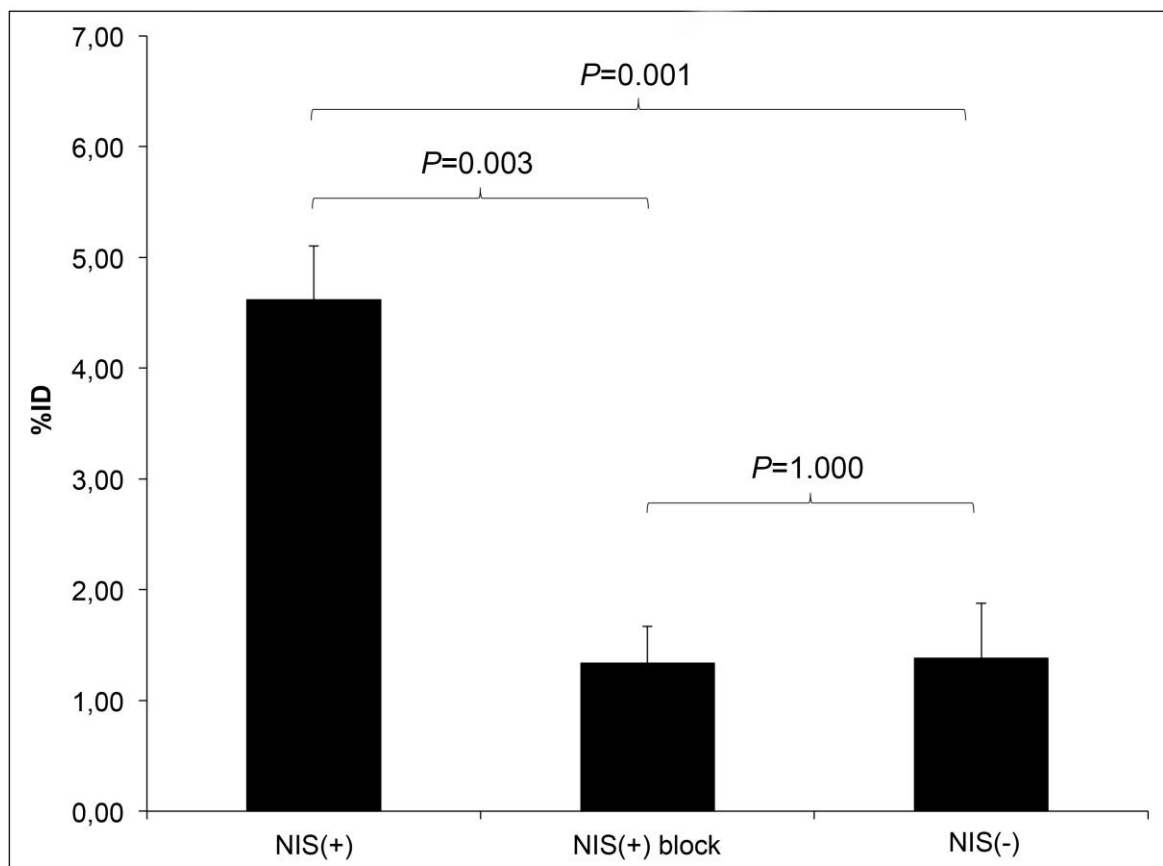


**Abbildung 3: *In vitro*-Jodaufnahme im Verhältnis zur Zellzahl.** Die Jodaufnahme zeigt sich im Zusammenhang zur Zellzahl steigend und ist hochspezifisch (\* $p < 0,05$ ).

Jede Säule entspricht zwei Wells der 12-Well Platte, die separat gemessen wurden (2 Messpunkte pro Säule).

### 3.4 *In vivo*-<sup>124</sup>I-Aufnahme und Korrelation mit der Teratommasse

Es konnte gezeigt werden, dass die <sup>124</sup>I-Aufnahme in die NIS+ ESC auch *in vivo* hochspezifisch erfolgte. Die %ID von <sup>124</sup>I in den NIS+ Tumoren war signifikant höher als die in den NIS-negativen Tumoren ( $4,62 \pm 0,49$  %ID vs.  $1,38 \pm 0,49$  %ID,  $p=0,014$ ). Eine systemische Perchloratgabe vor der PET-Untersuchung konnte die <sup>124</sup>I-Aufnahme auf das Niveau von nicht-transfizierten Zellen herabsetzen ( $1,34 \pm 0,33$  %ID vs.  $1,38 \pm 0,49$  %ID,  $P=0,905$ ; Abb. 4 und 5).

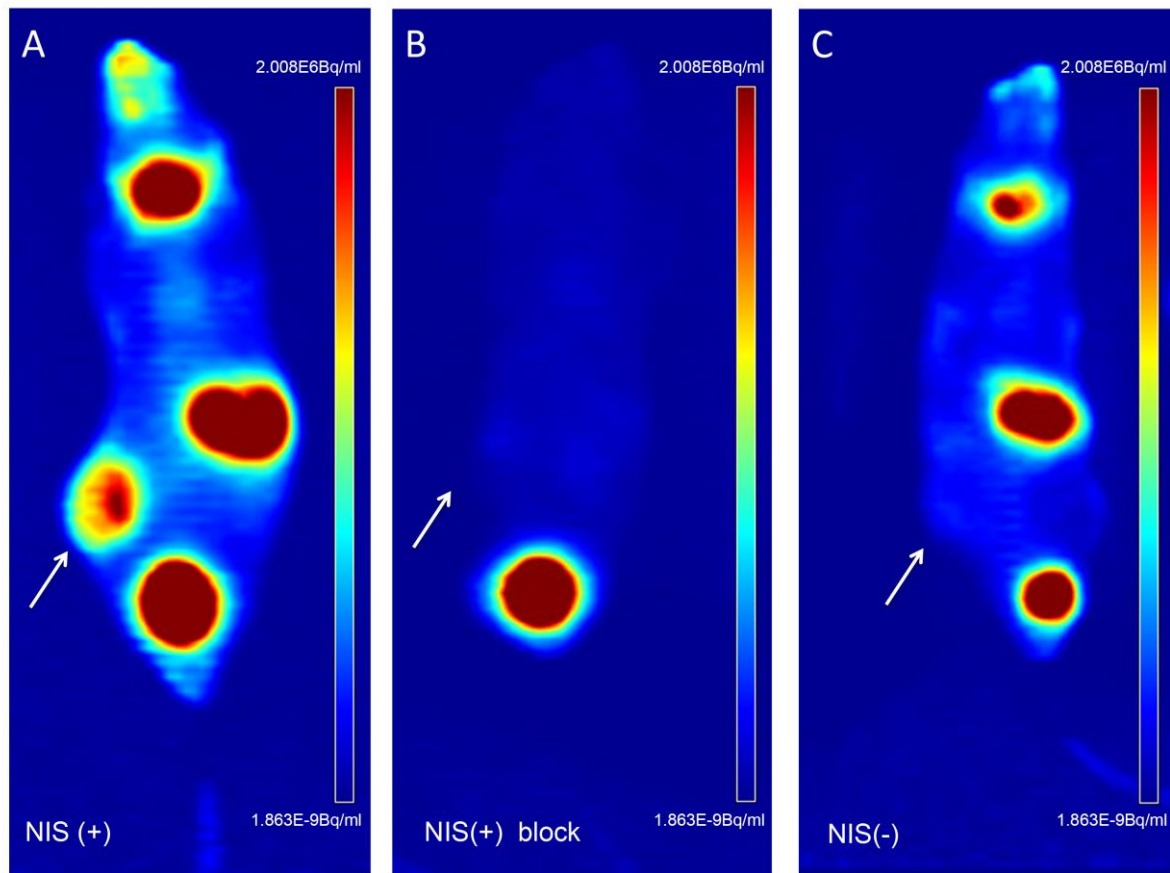


**Abbildung 4: *In vivo*-Aufnahme von <sup>124</sup>I in die Teratome:** Teratome aus NIS+ Zellen weisen eine signifikant höhere Jodaufnahme auf als Teratome, die vorher mit Perchlorat blockiert wurden, bzw. Teratome, die aus NIS-negativen Zellen bestehen. Die Jodaufnahme von blockierten Teratomen und Teratomen aus NIS-negativen Zellen unterscheidet sich nicht signifikant.

NIS(+): Teratome aus Zellen mit NIS-Expression.

NIS (+) block: Teratome aus Zellen mit NIS-Expression, die vorher mit Perchlorat blockiert wurden.

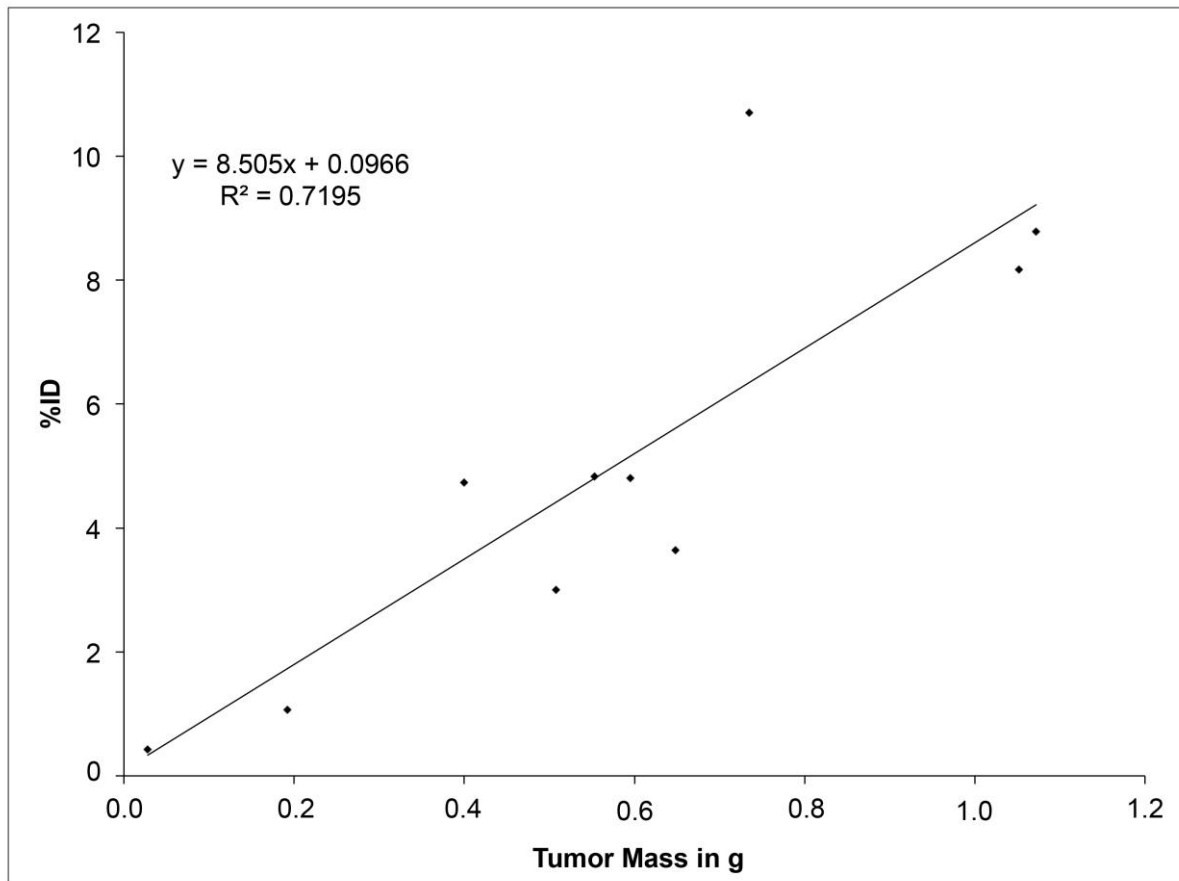
NIS (-): Teratome aus Zellen ohne NIS-Expression.



**Abbildung 5: Hochspezifische  $^{124}\text{I}$ -Aufnahme in die Teratome im PET-Bild.** Repräsentative koronale Schichten der  $^{124}\text{I}$ -PET-Untersuchungen. (A) zeigt die Jodaufnahme in das NIS+ Teratom (NIS (+)). Es ist außerdem die Jodaufnahme in die Speicheldrüsen im Bereich der Schnauze, der Schilddrüse im Bereich des Halses, in den Magen, sowie die Anreicherung in der Harnblase zu sehen. (B) zeigt die fehlende Jodaufnahme an der Stelle des NIS+ Teratoms, sowie die fehlende Aufnahme in Schilddrüse und Magen nach Perchloratgabe 30 Minuten vor der Untersuchung (NIS (+) block). Es zeigt sich weiterhin radioaktiver Urin in der Harnblase. (C) zeigt die fehlende Aufnahme an der Stelle des NIS-negativen Teratoms (NIS(-)), bei weiterhin vorhandener Aufnahme im Bereich der Speicheldrüsen, der Schilddrüse und des Magens. Unveränderte Darstellung der Harnblase mit radioaktivem Urin. Der Bereich des makroskopisch sichtbaren Teratoms ist in jedem Bild mit weißem Pfeil gekennzeichnet.

Die  $^{124}\text{I}$ -Aufnahme und die Teratommasse als Surrogat der Zellzahl im Teratom zeigten eine positive Korrelation. Durch eine graphische Darstellung der Teratommasse gegen die Jodaufnahme und mathematische Analyse konnte folgende Formel erstellt werden, welche die Korrelation zwischen den beiden Variablen bezeichnet ( $R^2=0,72$ ,  $p=0,002$ ; Abb. 6):

$$f(x) = 8,505x + 0,966$$

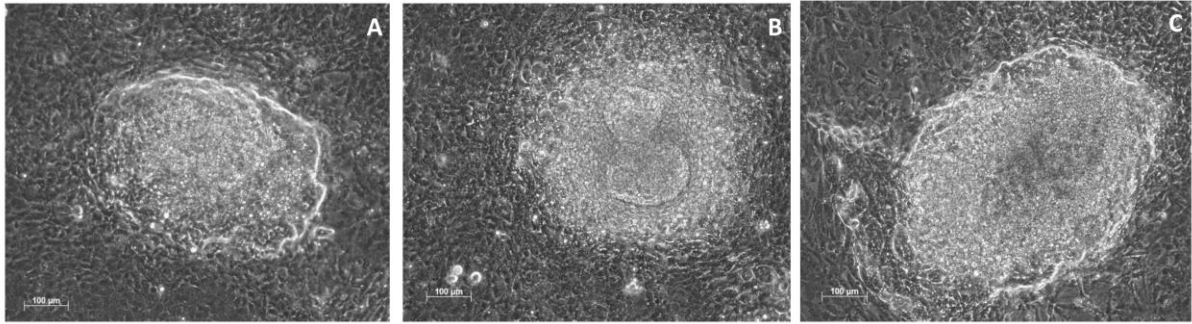


**Abbildung 6: Korrelation von %ID der  $^{124}\text{I}$ -Aufnahme und Tumormasse als Surrogat der Zellzahl.** Die Regressionskurve zeigt die signifikante positive Korrelation der Teratommasse und der Traceraufnahme ( $p=0,002$ )

### 3.5 Einfluss der Transfektion mit hNIS und der Radioaktivitätsexposition auf das Differenzierungspotential der Zellen *in vitro* und *in vivo*

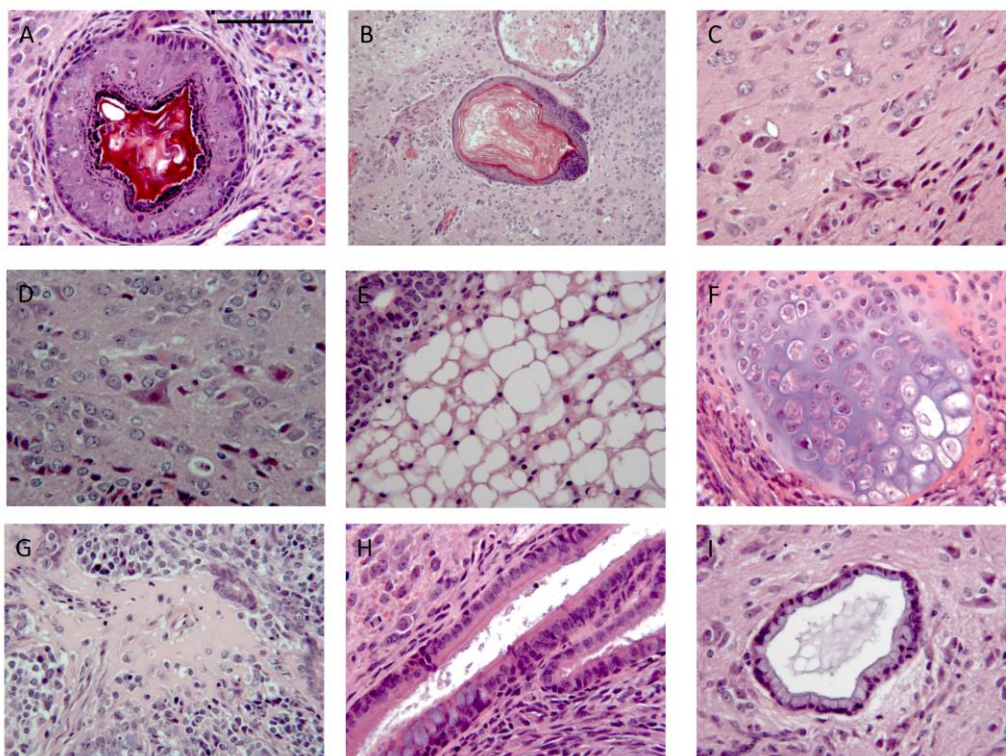
Es konnte gezeigt werden, dass weder die Transfektion mit NIS noch die Inkubation mit Radiojod die Differenzierung der ESC zu „Embryoid Bodies“ verhindert (Abb. 7). Die so entstandenen „Embryoid Bodies“ behielten das Potential, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren, was dadurch ersichtlich war, dass sich an Tag 12 der Differenzierung spontan-kontrahierende Foci bildeten.





**Abbildung 7: Entstehung von „Embryoid Bodies“ nach Transfektion mit hNIS und Inkubation mit  $^{124}\text{I}$ .** Die Inkubation der NIS+ Zellen mit  $^{124}\text{I}$  verhindert nicht die Entstehung von „Embryoid Bodies“ (A-C). Es zeigen sich unauffällige „Embryoid Bodies“. Eine Balkenlänge entspricht 100 µm.

Die histologische Auswertung der NIS+ Teratome, die während der PET-Untersuchung gegenüber  $^{124}\text{I}$  exponiert waren, ergab eine Differenzierung in alle drei Keimblätter: Ektoderm, Mesoderm und Entoderm (Abb. 8).



**Abbildung 8: Histologische Auswertung der NIS+ Teratome nach Exposition gegenüber  $^{124}\text{I}$ .** Es finden sich Derivate aller 3 Keimblätter. *Ektodermale Differenzierung:* (A, B) Mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel; (C, D) Neurone. *Mesodermale Differenzierung:* (E) Fettgewebe, (F) Chondrozyten, (G) Osteoidproduzierende Zellen. *Entodermale Differenzierung:* (H) zilienträgendes respiratorisches Epithel, (I) Drüsengewebe mit schleimproduzierenden Becherzellen. Eine Balkenlänge entspricht 100 µm.



Somit bestätigt sich, dass weder die NIS-Transfektion noch die Exposition gegenüber den Radionukliden das Differenzierungspotential der Zellen beeinträchtigen. Die Differenzierungsfähigkeit blieb darüber hinaus auch nach 28 Tagen erhalten.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Einleitende Bemerkungen

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass es möglich ist, murine ESC mit dem humanen NIS-Gen zu transfizieren, und dass die Transfektion über den untersuchten Zeitraum von 42 Tagen stabil bleibt. Die Funktionalität des NIS, Jod in die Zellen zu transportieren, sowie die spezifische Hemmung der Jodaufnahme durch Perchlorat konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bewiesen werden.

*In vitro* zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang der über den NIS aufgenommenen Jodmenge mit der Zellzahl. *In vivo* konnte eine signifikante Korrelation der Jodaufnahme mit der Tumormasse als Surrogat der Zellzahl im Tumor gezeigt werden. In beiden Fällen war die Jodaufnahme sowohl hochsensitiv (bis zu einer unteren Nachweisgrenze von  $5 \times 10^5$  Zellen) als auch hochspezifisch, wie durch die Blockadeexperimente sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte.

Hierbei muss ergänzend erwähnt werden, dass die Stichprobengröße in den Spezifitätsexperimenten eingeschränkt war. Obwohl die Spezifität mit hoher statistischer Signifikanz bewiesen werden konnte, und die vorliegende Studie aussagekräftig belegt, dass die Aufnahme von Jod über den NIS hochspezifisch erfolgt, werden ergänzende Studien mit großen Tierkohorten notwendig sein, um das Verständnis für die von uns beschriebenen Sachverhalte zu vertiefen.

Weiterhin zeigte sich eine erhaltene Fähigkeit der Zellen zur Bildung von „Embryoid Bodies“ und daraufhin zu allen Keimblättern, somit ein Erhalt der Pluripotenz und der Differenzierungsfähigkeit nach der Transfektion mit hNIS und der Exposition gegenüber  $^{124}\text{I}$  bzw.  $^{125}\text{I}$ .

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie ist es möglich, eine nichtinvasive Bildgebungsmethode anzubieten, welche die frühe, spezifische Detektion von Teratomen erlaubt, und zugleich den Weg für eine serielle *in vivo*-Nachverfolgung der Zellen sowie ein Therapiemonitoring nach Stammzelltransplantation bahnt.

## 4.2 Pluripotente ESC in der klinischen Anwendung

Wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben sind ESC seit ihrer ersten Beschreibung im Jahr 1981 intensiv erforscht worden. 1998 beschrieben Thomson et al. erstmals, dass sie eine humane embryonale Stammzelllinie *in vitro* kultivieren konnten. Bis zu diesem Zeitpunkt existierten zwar bereits viele Daten zur Genetik, Proliferation, Differenzierung und theoretischer Anwendbarkeit der ESC, jedoch ist die kontrollierte Kultivierbarkeit von ESC die wichtigste Voraussetzung für die Anwendung in der Therapie (153).

Die weiterführenden forschersischen Leistungen nach der ersten *in vitro*-Kultivierung von humanen ESC führten zur erstmaligen Anerkennung einer Stammzelltherapie am Menschen durch die amerikanische FDA im Jahr 2009. Es handelte sich hierbei um eine Phase-1-Therapiestudie, in der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zur Therapie von Rückenmarksverletzungen eingesetzt wurden (51). Kurze Zeit nach Beginn der Studie äußerte die FDA jedoch Bedenken aufgrund des möglichen Risikos der Teratomentstehung. Das Projekt wurde nachfolgend für mehr als zwei Jahre pausiert (51). Ebenfalls im Jahr 2009 publizierten Amariglio et al. eine Fallbeschreibung, bei der es nach der Transplantation von ESC in ein Kind zur Therapie des Louis-Bar-Syndroms (Ataxia teleangiectasia) zur Entstehung eines Teratoms im Gehirn kam (4). Der Sachverhalt der Entstehung von Teratomen im zentralen Nervensystem wurde bereits 2007 durch Riess et al. beschrieben, die jedoch ebenfalls schlussfolgerten, dass die ESC-Therapie nach Hirnschädigung zu einer „dramatischen Verbesserung des neurologischen Outcomes“ führt (124). Dieser Aussichtsreichtum der ESC-Anwendung führte dazu, dass auch in neuerer Zeit ESC-basierte Therapien zur klinischen Anwendung kommen. Im Jahr 2012 berichteten Schwartz et al. über eine erfolgreiche Anwendung von retinalen Pigmentepithelzellen, die aus hESC gewonnen wurden zur Therapie der trockenen Makuladegeneration und des Morbus Stargardt, worunter es nicht zur Teratombildung kam (129). Seit September 2013 werden durch Menasché et al. Patienten zur ersten Therapiestudie mit Anwendung von kardialen Progenitorzellen aus hESC zur Therapie der schweren Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt rekrutiert (ESCORT-Studie) (34). Die Bildung von intra- oder extrakardialen Tumoren wurde jedoch auch hier bereits im Studienantrag als schwere Therapienebenwirkung und Abbruchkriterium festgelegt (113).

Zusammenfassend muss somit festgestellt werden, dass die Anwendung von ESC vielversprechende Ergebnisse zeigt, und dass der Vormarsch der klinischen Anwendungen nicht aufzuhalten ist. Umso wichtiger ist also der sorgfältige Umgang mit den Zellen, sowie das grundlegende Verständnis des mit der ESC-Therapie einhergehenden Risikos der Teratombildung.

Lukovic et al. formulierten so im Jahr 2014 Voraussetzungen für die sichere, teratomfreie Anwendung von ESC am Menschen. Eine ihrer Prämissen war, dass eingehende Tierstudien notwendig sind, um die Sicherheit der ESC-Therapie in Bezug auf die Teratomentstehung zu erhöhen (94).

Als vielversprechendste Methode, um die Teratombildung zu umgehen, wurde die Anwendung hochaufgereinigter Zellsuspensionen beschrieben (57). Der Kerngedanke bei dieser Anwendung ist, dass die Bereitschaft der ESC, Teratome zu bilden, allein vom Anteil der bereits differenzierten Zellen in der Injektionssuspension abhängt (2). So konnten Dressel et al. 2008 zeigen, dass die Gabe undifferenzierter Zellen selbst in immunkompetenten Tieren zur Teratombildung führte (45). Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, exprimieren bereits undifferenzierte hESC humane MHC-Antigene, und die Expression verstärkt sich im Zuge der Differenzierung (44,144). Erwartungsgemäß müsste somit eine Abstoßung der humanen Zellen bei der Injektion in immunkompetente Tiere erfolgen (21). Dies war jedoch, wie durch Dressel et al. beschrieben, nicht der Fall, da sich bei Injektion von  $10^6$  Zellen in immunkompetente Mäuse in ca. 95% der Fälle trotzdem Teratome bildeten. Dies erklärt auch, warum in der soeben erwähnten Therapiestudie von Schwartz et al. (129) keine Teratombildung stattfand: Es wurden nicht die ESC an sich, sondern Progenitorzellen, die aus ihnen differenziert wurden, verabreicht. Auch Menasché et al. werden in der erwähnten ESCORT-Studie (113) myokardiale Progenitorzellen verabreichen, nicht jedoch undifferenzierte ESC.

Aldahmash et al. beschrieben die vollständige Entfernung undifferenzierter Zellen als Grundvoraussetzung für eine sichere Anwendung der ESC in Therapien (2). Für die Aufreinigung der ESC-Suspensionen kommen häufig flusszytometrische Methoden zur Anwendung, die die Zellen über Immun- oder andere Marker identifizieren und aufteilen (96). Tohyama et al. beschrieben eine modifizierte Methode, die die Zellen über die unterschiedliche Verstoffwechselung von Glukose und Laktat aufteilte und

somit Suspensionen mit bis zu 99%-iger Reinheit erzielte (155). Jedoch besteht auch bei einer 99%-igen Reinheit weiterhin ein Residualrisiko der Kontamination mit undifferenzierten Zellen, und somit das Risiko einer Teratomentstehung. Exemplarisch wurden in der vorliegenden Studie  $10^5$  Zellen pro Seite in die Tiere eingebracht, bei einer 99%-igen Suspensionsreinheit wären somit  $10^3$  Zellen nicht differenziert und somit potentiell teratombildend. Harkany et al. beschrieben eine Teratombildung bei einer Zellzahl von 400-500 bei immuninkompetenten Tieren (64) und Lee et al. postulierten, dass bereits „eine einzige undifferenzierte ESC unter optimalen Umständen ein Teratom bilden könnte“ (88). Andererseits lässt sich somit vermuten, dass die in der vorliegenden Studie angewandten  $10^5$  Zellen eine ausreichende Zellzahl zur sicheren Teratomgenerierung darstellen. Dies liegt etwas unter dem Niveau anderer Studien, die um die  $10^6$  Zellen für die Teratomentstehung anwendeten (2,127).

Solange also nicht auszuschließen ist, dass es bei einer Stammzelltherapie zur Tumorbildung kommen wird, ist es eine wichtige Aufgabe im Namen der Sicherheit der Therapieverfahren, eine solche Tumorbildung so früh wie möglich zu detektieren. Aus diesem Grund befasst sich die vorliegende Studie extensiv mit der Etablierung einer neuartigen, hochsensitiven Methode zur Feststellung einer Tumorbildung, selbst in frühen Stadien.

### **4.3 *In vivo*-Monitoring der Teratomentstehung**

Wie in Abschnitt 3.3 erwähnt, wurden erstmals in den 1960er Jahren pluripotente Zellen aus Teratokarzinomen isoliert (sogenannte embryonale Karzinomzellen, EC). Die Ähnlichkeit dieser EC-Zellen zu ESC war der Ausgangspunkt für die spätere Erforschung der ESC. Auch heute wird die Bildung von Teratomen als Beweis der Pluripotenz von ESC gesehen („Teratomassay“) (81,24). Die vorliegende Studie konnte die nachhaltige Pluripotenz der transgenen Zellen zeigen, indem Bestandteile aller Keimblätter in den histologischen Schnitten der Teratome nachgewiesen wurden. Wie in der Mehrzahl der Studien, in denen experimentell Teratome generiert wurden, wurden auch in der vorliegenden Studie die Teratome postmortal entnommen und untersucht, um eine Pluripotenz der applizierten Zellen nachzuweisen (118).

Eine alternative Methode hierzu wäre die serielle Entnahme von Biopsien aus den Teratomen, wie durch Buta et al. theoretisch beschrieben (24). Dies würde jedoch in eine höhere Belastung für die Tiere resultieren. Bis dato finden sich keine Studien, in denen eine *in vivo*-Untersuchung der Teratomhistologie beschrieben ist. Castro et al. beschrieben 2010 erstmals die Anwendung von hochauflösender MRT (sogenannte „Magnetresonanzmikroskopie“) zur nichtinvasiven, semiquantitativen histologischen Auswertung der Teratombestandteile (26). Weiterentwicklungen der MRT könnten in Zukunft ermöglichen, die Pluripotenz der untersuchten Zellpopulationen *in vivo* nachzuweisen, indem die Keimblätterbestandteile in den Teratomen nichtinvasiv untersucht werden.

Auch die Teratombildung an sich, die wie bereits beschrieben als gefürchtetste Therapieebenwirkung der Stammzelltransplantation gilt (89), konnte in der vorliegenden Studie mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen und überwacht werden.

Im Jahr 2006 beschrieben Cao et al. erstmals die *in vivo* Detektion von Stammzellen im Herzen mittels Bildgebung (25). Ihnen gelang die Transfektion von murinen ESC mit einem Dreifachgen bestehend aus dem Gen der Luciferase des Glühwurms (fLuc), dem Gen für das monomere rotfluoreszierende Protein sowie einer verkürzten Thymidinkinase. Die Genprodukte dieses sogenannten „Triple-fusion-Gens (fluc-mrpf-ttk)“ konnten dann sowohl mittels *in vivo*-Fluoreszenz, Biolumineszenz, als auch nach Injektion von  $^{18}\text{F}$ -FHBG mittels PET abgebildet werden. Für die Abbildung des normalen Myokards wurde  $^{18}\text{F}$ -FDG angewendet.

Obwohl die Transfektion der Zellen stabil, und die Bildgebung mittels optischer Verfahren bzw. PET in dieser Studie erfolgreich war, eignet sich die von Cao et al. verwendete Konstellation nicht optimal für die Bildgebung von Teratomen: Weder  $^{18}\text{F}$ -FHBG noch  $^{18}\text{F}$ -FDG sind gut für benigne Tumoren geeignete Tracer, da sie in diesen meist keine ausreichende Aufnahme aufweisen (25). Spätere Studien wendeten daher Fusionsgene aus fLuc und einer Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase an, um die Teratombildung im Mausmodell zu detektieren (143,114). Jedoch ist fLuc nicht für die Anwendung am Menschen zugelassen (13). Außerdem sind optische Visualisierungsmethoden in Großtiermodellen und am Menschen nicht anwendbar, da die starke Lichtschwächung dazu führt, dass meist überhaupt keine Daten akquiriert werden können (68). Somit sind Methoden, die vorrangig auf solchen Visualisie-

rungsmethoden basieren, für die translationale Anwendung ungeeignet. Die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase ist hingegen bereits für die *in vivo*-Nachverfolgung von menschlichen Zellen benutzt worden. Der entsprechende Tracer  $^{18}\text{F}$ -FIAU ist von der amerikanischen FDA für die Anwendung am Menschen zugelassen, jedoch potentiell immunogen (172).

Im Jahr 2009 beschrieben Cao et al. einen alternativen Ansatz für die indirekte Visualisierung von Teratomen. Sie stellten fest, dass die Entstehung von Teratomen mit ausgeprägter Neoangiogenese einhergeht und stellten diese mittels  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-RGD4, einem Liganden des  $\alpha\beta 3$ -Integrins dar (25,25). Es ist jedoch zu bedenken, dass die Bildgebung einen Eingriff in die Neovaskularisation darstellen kann, die ja im Falle der Stammzelltherapie zur Regeneration ischämisch geschädigter Gewebe durchaus ein erwünschter Effekt sein kann.

Als humanes Protein birgt hNIS das Potential der Immunogenität im Tiermodell, weswegen in der vorliegenden Studie immundefiziente Tiere zur Anwendung kamen. Es hat jedoch den Vorteil, dass eine Immunogenität beim Menschen nicht zu erwarten ist (147). Dies könnte für eine translationale Anwendung der Methode von Vorteil sein. Weiterhin kann, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Forschungsarbeit gemutmaßt werden, dass hNIS über Wochen bis Monate aktiv exprimiert wird. Somit besteht genügend Zeit, die Teratomentstehung bildgebend zu untersuchen. Es sind jedoch weitere longitudinale Studien notwendig, um die hNIS-Expression über den 42en Tag nach Injektion hinaus zu untersuchen.

Als Einschränkung der Methode muss erwähnt werden, dass die Jodaufnahme zwar spezifisch für NIS-exprimierende Zellen ist, jedoch nicht von der Zellart abhängig ist. Somit kann vom Vorhandensein des PET-Signals alleine nicht auf das Vorhandensein eines Teratoms geschlossen werden. Jedoch ist der Vorteil der nichtinvasiven *in vivo*-Bildgebung die Wiederholbarkeit und somit die Möglichkeit einer seriellen Untersuchung. Somit kann die Wachstumsdynamik der Zellen analysiert werden und zwischen Teratomen und normal funktionierenden Zellen unterschieden werden: Teratome würden erwartungsgemäß ein schnelleres Wachstum, und somit eine schnellere Signalzunahme aufweisen. Die Möglichkeiten der absoluten Quantifizierung, die durch die PET-Bildgebung ermöglicht werden, bieten hier einen Vorteil gegenüber anderen Bildgebungsmethoden (S. Abschnitt 4.5.).

Ein mögliches Zukunftsziel könnte somit die Konstruktion proliferationsabhängiger Promotoren sein, die eine selektive Hochregulation der hNIS-Expression in Teratomen bedingen.

#### **4.4 Auswirkung der Transfektion und der Radioaktivität auf die ESC**

Die in Abschnitt 2.2 beschriebenen Erfolge der Stammzelltherapien mit ESC betonen den Aussichtsreichtum solcher therapeutischer Anwendungen. Trotz großer forschender Bemühungen in den letzten Jahren ist jedoch der genaue Mechanismus der Geweberegeneration mittels Stammzellen nicht vollständig geklärt. Die Möglichkeit der Forschung mit Reportergenen hat Studien ermöglicht, die sowohl das Schicksal der Zellen nach der Transplantation als auch die Reparaturmechanismen an sich weiterführend untersuchten (126).

Eine wichtige Fragestellung im Rahmen solcher Studien war und ist, ob die Transfektion mit Reportergenen und die Expression ihrer Genprodukte grundlegende Eigenschaften der Stammzellen wie das Zellüberleben, die Proliferation und die Differenzierungsfähigkeit beeinflusst (170). Veränderungen dieser Eigenschaften könnten die translationale Anwendbarkeit von Reportergenmodellen bedeutend einschränken. In zwei Studien aus dem Jahr 2006 befassten sich Wu et al. mit dieser Fragestellung, indem sie das Verhalten von ESC untersuchten, die zuvor mit einem Triple-Fusion-Gen transfiziert worden waren. Sie stellten fest, dass zwar auf Transkriptions- und Translationsebene kleine Veränderungen stattfanden, diese jedoch nicht zu Einschränkungen des Überlebens, der Proliferation oder der Differenzierungsfähigkeit der Zellen führten (170,169).

In den oben erwähnten Studien von Cao et al. (25) erfolgte die Transfektion der Zellen mittels adenoviraler Vektoren. Solche Vektoren werden seit Mitte der 1990er Jahre zur Einführung von genetischem Material in Zielzellen genutzt (90). Im Jahr 1999 kamen sie erstmals bei der Durchführung einer Gentherapie zum Einsatz, jedoch starb der Patient 4 Tage nach Injektion des Vektors an einer massiven Immunreaktion (133). Die Tatsache, dass adenoviral transfizierte Zellen potentiell immunogen sind (159), die potentielle Zytotoxizität des Vektors selber (31) sowie die Tatsache,



dass adenoviral integrierte Gene potentiell nicht stabil ins Genom integriert werden, (167) stellen Einschränkungen dieser Methode für die klinische Translation dar. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde die Transfektion mittels Elektroporation der Zellen durchgeführt. Obwohl diese Methode zu geringerer Ausbeute an transfizierten Zellen führt, ist sie als physikalische Methode wesentlich sicherer (103). Da kein Vektor zur Anwendung kommt, besteht allein das Risiko einer Immunogenität des exprimierten Proteins, die im Falle von hNIS wie erwähnt vermutlich nicht vorliegt (147). Weiterhin ist die Expression des Reportergens über die gesamte untersuchte Zeit stabil geblieben, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben. Die Stabilität der Transfektion war weiterhin auch ohne Selektionsdruck durch Hygromycin gegeben. Dies stellt eine Grundvoraussetzung für eine längerfristige *in vivo*-Anwendung der Zellen dar.

Eine weitere Fragestellung betrifft die Auswirkungen der Radioaktivitätsexposition auf die Zellen. Sokolov et al. beschrieben 2012, dass eine Bestrahlung mit 2 Gy Gammastrahlung zu einer Veränderung der Genexpression führte und 4 Gy zu einem Zelltod von >70% der untersuchten ESC (136). Spitzweg et al. untersuchten die Auswirkungen von  $^{131}\text{I}$  auf NIS-transfizierte Zellen von Prostatakarzinomen und kamen zu dem Schluss, dass 80  $\mu\text{Ci}$  (entsprechend 2,96 MBq) über eine Expositionszeit von 7 Stunden zum Zelltod führten (140). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine Exposition der Zellen gegenüber 3,7 kBq  $^{125}\text{I}$  für 45 Minuten keine Verschlechterung der Vitalität oder Differenzierungsfähigkeit der Zellen zur Folge hatte. Somit ist bei den im vorliegenden Modell angewandten Aktivitätskonzentrationen kein negativer Einfluss der Radioaktivität auf die Pluripotenz der Zellen zu erwarten.

Wie in Abschnitt 3.3 erläutert, konnte nach Transfektion und Exposition der Zellen gegenüber Radioaktivität die Entstehung normaler, schlagender „Embryoid Bodies“ demonstriert werden. Die Zellen differenzierten sich nach Injektion in die Tiere zu allen drei Keimblättern. Somit wurde schlussgefolgert, dass die Expression von NIS und die darauf folgende Exposition gegenüber Radioaktivität weder *in vitro* noch *in vivo* zu einer durchgreifenden Veränderung der Differenzierungsfähigkeit der Zellen führte, und dass die Pluripotenz der Zellen erhalten blieb.

## 4.5 hNIS als Reporter gen für quantitative Analysen

Wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, findet sich der NIS vorrangig in der Schilddrüse, der Magenschleimhaut und den Speicheldrüsen (43). Dadurch, dass keine relevante Aufnahme in andere Gewebe erfolgt, ist das NIS-Gen als Reporter gen für die sensitive Zelldarstellung in der Muskulatur, dem Gehirn, sowie in inneren Organen wie dem Herzen geeignet (26). Wie bereits beschrieben, befördert der NIS mit Hilfe des transmembranalen Natriumgradienten Jodanionen, sowie im Kontext der Bildgebung,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  oder Radiojod in die Zelle (43,149). Die Aufnahme dieser Anionen kann durch Perchlorat kompetitiv blockiert werden (33). Diese Konstellation ermöglicht eine spezifische Visualisierung von Zellen, die das NIS-Gen exprimieren: über  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  mittels SPECT oder über  $^{124}\text{I}$  mittels PET (149).

Für die Visualisierung von Stammzellen stehen mehrere Techniken zur Verfügung. Die 2006 veröffentlichte Studie von Cao et al. bediente sich im Kleintiermodell sowohl optischer Methoden als auch der  $^{124}\text{I}$ -PET. Wie in Abschnitt 5.4 erwähnt, sind optische Methoden für die translationale Anwendung ungeeignet, da das Licht im Großtier und im Menschen keine ausreichende Gewebedurchdringung aufweist, sie sind jedoch in Kleintiermodellen sehr verbreitet. Vorteile sind die einfache Durchführbarkeit, die geringen Kosten sowie die hohe Sensitivität (68). Da auch sie auf Reporter genbildung basieren, müssen Zellen für die optische Visualisierung genetisch modifiziert werden, was potentiell Veränderungen der Differenzierung oder Vitalität zur Folge hat (71). In den letzten Jahren haben sich solche Methoden vor allem in Kombination mit Methoden wie PET bewährt, wie die Studie von Cao et al. (25) zeigte (166).

Eine vielversprechende Methode zur Stammzellvisualisierung ist die MRT mit Nanopartikeln, die in Abschnitt 2.4 beschrieben wurde. Der größte Vorteil der Methode ist die hohe räumliche Auflösung und hohe Sensitivität für die Detektion der markierten Zellen (84). Jedoch setzen die Zellen nach ihrem Tod die Nanopartikel frei, und diese werden teilweise von Makrophagen internalisiert. Da die Nanopartikel jedoch weiterhin signalgebend sind, fällt die Spezifität der Methode für die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen über die Zeit erheblich ab (150). Higuchi et al. führten 2009 eine Studie mit kombinierter MRT- und PET-Bildgebung von intramyokardial transplantierten Stammzellen durch. Sie fanden heraus, dass das  $^{124}\text{I}$ -Signal der

Zellen nach 3 Tagen nicht mehr nachweisbar war, sich jedoch bis Tag 7 noch Nanopartikel in der MRT darstellten, obwohl sich in der daraufhin durchgeführten Histologie keine Stammzellen mehr im Bereich befanden (65). Die fehlende Möglichkeit der seriellen, longitudinalen Auswertung relativiert somit bislang den Nutzen der MRT in der Stammzellbildung.

Die SPECT-Bildgebung hat im Kleintiermodell den Vorteil der hohen räumlichen Auflösung, die z.T. unter einem Millimeter liegt (16). Jedoch geht die hohe Auflösung des Systems unvermeidlich mit einer geringeren Sensitivität einher (27). Weiterhin bestand über lange Zeit nur eine eingeschränkte Möglichkeit, die injizierte Aktivität im untersuchten Objekt absolut zu quantifizieren. Erst in den letzten Jahren wurden SPECT-Systeme entwickelt, die eine absolute Quantifizierung der Aktivität erlauben (125). Die Möglichkeit, über den NIS sowohl eine SPECT-Bildgebung als auch eine PET-Bildgebung durchzuführen, stellt einen Vorteil des Modells dar, da in Zukunft solche leistungsfähigen SPECT-Systeme für die Stammzellvisualisierung zur Anwendung kommen werden können.

Weiterhin ist die SPECT eine in der Klinik übliche Bildgebungsmodalität. Sowohl  $^{99m}\text{Tc}$  als auch  $^{124}\text{I}$  kommen in der klinischen Diagnostik zur Anwendung, und sind somit erprobt sowie einfach erhältlich (32). NIS-basierte PET-Protokolle wurden bereits für die Nachverfolgung intramyokardial injizierter Zellen sowohl im Klein- als auch im Großtiermodell angewandt (149,147), was das Potential der Möglichkeit für eine spätere klinische Translation aufzeigt.

Obwohl die SPECT in der Kleintierforschung teilweise bessere Ortsauflösung bietet als die PET, ist die Auflösung von klinischen PET-Systemen höher und die PET ermöglicht eine wesentlich höhere Sensitivität (30). Die Akquisition von quantitativen Daten ist weiterhin eine intrinsische Eigenschaft der PET, die in allen gebräuchlichen Systemen unkompliziert durchgeführt werden kann (28,79). Die Möglichkeit der Kombination von PET und CT verbessert die Ortsauflösung weiter und macht die PET/CT zu einem nützlichen Werkzeug im klinischen Alltag, beispielsweise bei Staginguntersuchungen von Tumorpationen (52). Die vorliegende Studie befasste sich jedoch nicht mit der postdiagnostischen Untersuchung der Tumorausdehnung, wie dies bei einer Staginguntersuchung der Fall ist, sondern mit der primären Detektion des Tumors so früh wie möglich nach seiner Entstehung. Aus diesem Grund sind

die Möglichkeit der Akquisition von quantitativen Daten und die hohe Sensitivität und Spezifität von größerer Bedeutung als die minimal erreichbare Ortsauflösung.

Obwohl die Spezifität der Nachweismethode eine Eigenschaft des NIS darstellt, sind die maximale Ortsauflösung und die Sensitivität der Bildgebungsmethode sowohl vom PET-System, als auch vom verwendeten Radionuklid und von der Rekonstruktionsmethode abhängig.

Das in der vorliegenden Studie angewandte  $^{124}\text{I}$  hat als Jodisotop den bereits erwähnten Vorteil der sensitiven und spezifischen Aufnahme über den NIS.  $^{124}\text{I}$  hat jedoch eine komplexe Zerfallskinetik, die spezifische technische Überlegungen bei der Anwendung in der PET-Bildgebung nötig macht. Im Gegensatz zu häufig angewandten PET-Isotopen wie  $^{68}\text{Ga}$  oder  $^{18}\text{F}$ , zerfallen  $^{124}\text{I}$ -Atome in nur ca. 23% der Fälle mittels beta(+)-Zerfall zu Positronen (168). Weiterhin zerfällt  $^{124}\text{I}$  nicht durchgehend zum Grundzustand des Tochternuklids, sondern teilweise zur angeregten Form des Nuklids  $^{124}\text{Te}$ , welches daraufhin eine Photonenkaskade freisetzt, während es in niedrigerenergetischere Formen übergeht (70). Die Kombination aus geringen Zerfallsraten und der Tatsache, dass keinerlei Zusammenhang der Richtung, in der die Photonen der Kaskade freigesetzt werden zu den Bahnen der durch Paarvernichtung freigesetzten Photonen besteht, führt einerseits zur Notwendigkeit längerer Messzeiten und andererseits zur Entstehung einer Reihe von Zufallskoinzidenzen am Detektorring, die sich negativ auf die Bildqualität auswirken, und die mittels Akquisitionsoptimierungsmethoden korrigiert werden müssen (82).

Pentlow et al. untersuchten die Auswirkung der Zerfallscharakteristika von  $^{124}\text{I}$  auf die Akquisition quantitativer Daten im PET-System. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass keine signifikante Degradierung der quantitativen Daten durch die Benutzung von  $^{124}\text{I}$  auftrat (111).

Die maximale Ortsauflösung beträgt -im in der vorliegenden Studie angewandten Siemens Inveon micro-PET-System- ca. 1,5mm bei der Verwendung von  $^{18}\text{F}$  (12). Daten zur minimalen Ortsauflösung bei der Benutzung von  $^{124}\text{I}$  liegen jedoch nur für andere PET-Systeme vor. Gregory et al. fanden hierbei heraus, dass die Nutzung von  $^{124}\text{I}$  zu einer Verschlechterung der Ortsauflösung um ca. 500  $\mu\text{m}$  gegenüber der Verwendung von  $^{18}\text{F}$  auftrat (61). Dies trat jedoch bei der Anwendung eines klinischen PET-CT-Scanners auf, dessen maximale Auflösung bei ca. 4 mm liegt (115).

Ob dies auch bei der Verwendung von micro-PET Systemen im selben Maße auftritt, ist somit unerforscht.

Da diese Limitationen bei der Verwendung von  $^{124}\text{I}$  seit längerem bekannt sind, wird die Akquisitionsoptimierung bei Anwendung des Tracers intensiv erforscht. Lubberink et al. beschrieben 2011 eine Reihe von Optimierungsmethoden, die zu einer „quantitativ akkuraten Bildgebung mit verbessertem Kontrast“ führen (93).

Eine weitere Verbesserung der Bildqualität ist durch die differenzierte Anwendung moderner Rekonstruktionsmethoden erreichbar:

Für die Rekonstruktion der während einer PET-Untersuchung akquirierten Datensätze kommen unterschiedliche Methoden in Frage. Analytische Rekonstruktionsmethoden versuchen die Entstehung des Bildes mathematisch zu beschreiben, wofür mathematische Gleichungen („Fourier-Transformationen“) und sogenannte „Rückprojektionen“ zur Anwendung kommen, also vereinfacht Projektionen der am runden Detektor erhobenen Daten auf ein quadratisches Bildpunktraster (1). Eine verbreitete analytische Rekonstruktionsmethode ist die „gefilterte Rückprojektion“ (Filtered Back Projection). Die Vorteile solcher Methoden sind die relativ einfache Berechenbarkeit, so dass weder eine hohe Rechenleistung, noch sehr viel Zeit für die Rekonstruktion von Bildern benötigt wird (1). Der Nachteil ist jedoch, dass analytische Rekonstruktionsmethoden relativ fehleranfällig sind, was sich in minderer Bildqualität und geringerer Akquisition quantitativer Daten äußert (164). Aus diesem Grund werden zunehmend sogenannte iterative Rekonstruktionsmethoden für die PET-Rekonstruktion, aber auch für andere Bildgebungsmodalitäten angewandt.

Iterative Rekonstruktionsverfahren bringen die Möglichkeit mit sich, das Bildrauschen im Rohdatensatz zu kompensieren, indem sie mathematische Gleichungen aufstellen, die nicht eindeutig lösbar sind. Eine Lösung, und somit eine Rekonstruktion der Daten, wird durch die mehrmalige Wiederholung der Berechnungen statistisch eingegrenzt, bis ein akzeptables Ergebnis (also ein rekonstruiertes Bild) gefunden wird (109). Solche Verfahren wie die „ordered subset expectation maximization“ (OSEM) bzw. dessen dreidimensionale Variante OSEM3D oder die „maximum *a posteriori*“ (MAP) sind erheblich rechenintensiver. Sie erfordern somit wesentlich längere Zeit für die Berechnung, führen jedoch zur Rekonstruktion von Bildern mit höherer

Ortsauflösung und höherer Nachweissensitivität (164). Diese Tatsache wurde auch von Visser et al. für das Siemens Inveon micro-PET-System bestätigt (158).

Wie in Abschnitt 3.6 erwähnt, wurden die beschriebenen Erkenntnisse sowohl in der Bereinigung der durch  $^{124}\text{I}$ -PET entstandenen Rohdatensätze als auch in deren Rekonstruktion mittels OSEM3D und MAP eingebracht.

Eine häufig gestellte Frage bei der Bildgebung von Tumoren mittels PET ist die minimale nachweisbare Zellzahl. Sowohl Johnson et al. (73) als auch Fischer et al. (48) gaben an, dass das untere Limit der Zelldetektion mittels  $^{18}\text{F}$  bei ca.  $10^5$  Zellen lag. Keine der erwähnten Studien befasste sich jedoch mit der *in vivo*-Bildgebung von Teratomen. Fischer et al. führten eine *in vitro*-Studie durch, während Johnson et al. die minimale detektierbare Zellzahl in einem ektop wachsenden Adenokarzinom der Prostata untersuchten. Eine Angabe von absoluten Zellzahlen ist im Falle von Teratomen nahezu unmöglich, wie auch aus Abb. 8 ersichtlich ist: Teratome bestehen aus unterschiedlichen Zellen, sowie aus intrazellulärer Matrix, Nekrosearealen und zellfreiem Raum. Im Falle des Frühnachweises von Teratomen ist somit der Versuch einer Angabe von Zellzahlen nicht zielführend. Stattdessen quantifizierte die vorliegende Studie erstmals Teratome anhand ihrer Masse in Korrelation zur Traceraufnahme, die mit der Zellzahl im Tumor zusammenhängt. Vorhandene Forschungsarbeiten befassten sich zwar mit der Detektion von Teratomen im Kleintiermodell, jedoch fand keine Korrelation der Masse zur Traceraufnahme statt (25,114). Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, konnten mittels quantitativer  $^{124}\text{I}$ -PET Teratome mit einer minimalen Masse von 0,081 g erfolgreich dargestellt, sowie ihre Traceraufnahme quantifiziert werden.

Weiterhin eignet sich das in dieser Studie angewandte Modell ausgezeichnet für die längerfristige Nachuntersuchung der Zellen. Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, kann die Visualisierung von Stammzellen auch nach deren Markierung mittels Nanopartikeln oder radioaktiven Tracern erfolgen. So beschrieben Lang et al. die *in vivo*-Nachverfolgung von intramyokardial transplantierten Stammzellen im Infarktmodell der Maus nach Markierung der Zellen mit  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxyglucose (87). Die wichtigsten Einschränkungen dieser Methode liegen in der Beschränkung durch die Halbwertszeit der Nuklide. Im Fall der Nanopartikel-MRT liegt die Einschränkung, wie bereits erwähnt, in der abfallenden Spezifität nach Apoptose der Zellen. Der Vorteil

des Reporter-genmodells liegt darin, dass die Zellen während ihres gesamten Lebenszyklus das Reporter-gen exprimieren, wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde. Wenn, wie im vorliegenden Modell, die Expression stabil und selektionsdruckunabhängig erfolgt, und das Reporter-gen auch an die folgenden Generationen weitergegeben wird, sind der Nachverfolgung der Zellen seitens des Reporter-genmodells keine zeitlichen Grenzen gesetzt. Weiterhin ist  $^{124}\text{I}$  ein langlebiges Nuklid mit einer Halbwertszeit von 4,2 Tagen (111), was gegebenenfalls mehrere Bildgebungsdurchläufe nach nur einer Tracerinjektion erlaubt, womit eine geringere Strahlenbelastung zu erreichen ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Stammzelltherapie gilt als vielversprechender Ansatz, um die Funktion irreversibel geschädigter Organe, wie des Herzens und des zentralen Nervensystems, wiederherzustellen. Die Pluripotenz von embryonalen Stammzellen erlauben ihnen, *in vitro* und *in vivo* zu jeder erwünschten Zellart differenziert zu werden. In der klinischen Anwendung birgt die Pluripotenz jedoch die Gefahr der Teratombildung durch eine Verunreinigung der angewandten Zellsuspensionen mit undifferenzierten pluripotenten Zellen. Solange eine hundertprozentige Reinheit solcher Zellsuspensionen nicht mit letzter Sicherheit gewährleistet werden kann, ist die *in vivo*-Früherkennung der Teratombildung unabdingbar. Somit befasste sich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit mit der Etablierung des humanen Natrium-Jodid-Symporter-Gens (hNIS) als Reportergen für eine Positronenemissionstomographie (PET)-basierte, hochsensitive Überwachung der Teratombildung im Mausmodell.

Zu diesem Zweck wurden, nach Etablierung eines stabil hNIS-exprimierenden murinen embryonalen Stammzellklons, Stammzellen in die Hinterläufe immundefizienter Mäuse injiziert, um die Teratombildung zu induzieren. Daraufhin wurden wöchentlich zwischen Tag 14 und Tag 42  $^{124}\text{I}$ -PET-Untersuchungen durchgeführt. Zu jedem Untersuchungstag wurden 2 Teratome exzidiert, ihre Dimensionen gemessen und die Teratome histologisch untersucht. Eine Regressionskurve wurde zur Korrelation der  $^{124}\text{I}$ -Aufnahme mit der Teratommasse errechnet. Die Spezifität der Jodaufnahme wurde durch eine *in vivo*-Blockade des hNIS mittels Perchlorat bestätigt.

Somit zeigte sich, dass die transgene hNIS-Expression die Pluripotenz und das Differenzierungspotential der Zellen nicht beeinträchtigt. Die Jodaufnahme in die Teratome war hochspezifisch, da die *in vivo*-Blockade mit Perchlorat in den Teratomen zu einer ähnlich geringen Aufnahme führte, wie sie in nicht-transgenen Tumoren gemessen wurde. Die Regressionsanalyse zeigte eine positive Korrelation der Tumormasse mit der Radionuklid Aufnahme.



## 6 AUSBLICK

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit ist die erste Studie, in der die Generierung und Selektion stabil hNIS-transfizierter und exprimierender muriner ESC gelang. Die Differenzierungsfähigkeit der Zellen blieb hierbei trotz der Expression des transgenen Reportergerneproteins erhalten. Somit sind hNIS-exprimierende ESC für zahlreiche Anwendungen geeignet, sowohl in ihrer undifferenziert-pluripotenten Form, als auch in Form von aus ihnen differenzierten Zellen. Eine der größten Einschränkungen der Stammzellenanwendung, die potentielle Teratomentstehung, kann mittels  $^{124}\text{I}$ -PET *in vivo* über einen Zeitraum von mindestens 42 Tagen mit hoher Sensitivität, Spezifität sowie auf quantitativer Ebene erfasst werden. Die zu erwartende, fehlende Immunogenität des hNIS im Menschen macht das hNIS-Gen zu einem vielversprechendem Reportergerne für die klinisch-translationalen Anwendung des Modells.

## 7 LITERATUR

1. **Adam Alessio, PhD and Paul Kinahan, PhD.** PET Image Reconstruction. Ab-rufbar unter <http://faculty.washington.edu/aalessio/papers/alessioPETRecon.pdf>. Zuletzt ge-prüft am 05.04.2015.
2. **Aldahmash, A., Atteya, M., Elsafadi, M., Al-Nbaheen, M., Al-Mubarak, H.A., Vishnubalaji, R., Al-Roalle, A., Al-Harbi, S., et al.,** 2013. Teratoma For-mation in Immunocompetent Mice After Syngeneic and Allogeneic Implantation of Germline Capable Mouse Embryonic Stem Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 14:5705–5711.
3. **Ali, M.A., Dayan, C.M.,** 2009. Review: The importance of residual endogenous beta-cell preservation in type 1 diabetes. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*. 9:248–253.
4. **Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B.W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., et al.,** 2009. Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Telangi-ectasia Patient. *Plos Med*. 6:e29.
5. **Anderson, C.,** 1933. The Positive Electron. *Phys. Rev*. 43:491–494.
6. **Andrews, P.W., Matin, M.M., Bahrami, A.R., Damjanov, I., Gokhale, P., Draper, J.S.,** 2005. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochemical Society transactions*. 33:1526–1530.
7. **Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., et al.,** 2011. Highly efficient miRNA-mediated repro-gramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 8:376–388.
8. **Antonic, A., Sena, E.S., Donnan, G.A., Howells, D.W.,** 2012. Human in vitro models of ischaemic stroke: a test bed for translation. *Transl Stroke Res*. 3:306–309.
9. **Arbab, A.S., Frank, J.A.,** 2008. Cellular MRI and its role in stem cell therapy. Vol. 3, No. 2, Pages 199-215.

10. **Ashcroft, F.M., Rorsman, P.**, 2012. Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. *Cell*. 148:1160–1171.
11. **Baldwin, T.**, 2009. Morality and human embryo research. Introduction to the Talking Point on morality and human embryo research. *EMBO Rep*. 10:299–300.
12. **Bao, Q., Newport, D., Chen, M., Stout, D.B., Chatziioannou, A.F.**, 2009. Performance evaluation of the inveon dedicated PET preclinical tomograph based on the NEMA NU-4 standards. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 50:401–408.
13. **Baril, P., Martin-Duque, P., Vassaux, G.**, 2010. Visualization of gene expression in the live subject using the Na/I symporter as a reporter gene: applications in biotherapy. *British journal of pharmacology*. 159:761–771.
14. **Barrington, S.F., Wahl, R.L., Maisey, M.**, 2006. Atlas of clinical positron emission tomography. Hodder Arnold; Distributed in the United States of America by Oxford University Press. London, New York.
15. **Becker, A.J. et al.**, 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963 Feb 2;197:452-4.
16. **Beekman, F.J.**, van der Have, Frans, **Vastenhouw, B.**, van der Linden, Annemarie J A, van Rijk, Peter P, Burbach, J Peter H, **Smidt, M.P.**, 2005. U-SPECT-I: a novel system for submillimeter-resolution tomography with radio-labeled molecules in mice. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 46:1194–1200.
17. **Berezin, A.E.**, 2014. Diabetes mellitus and cellular replacement therapy: Expected clinical potential and perspectives. *WJD*. 5:777.
18. **Blum, B., Benvenisty, N.**, 2008. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv. Cancer Res*. 100:133–158.
19. **Boddington, S., Henning, T.D., Sutton, E.J., Daldrup-Link, H.E.**, 2008. Labeling stem cells with fluorescent dyes for non-invasive detection with optical imaging. *J. Vis. Exp.* (14), e686.

20. **Boddington, S.E., Henning, T.D., Jha, P., Schlieve, C.R., Mandrussow, L., DeNardo, D., Bernstein, H.S., Ritner, C., et al.**, 2010. Labeling human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with indocyanine green for noninvasive tracking with optical imaging: an FDA-compatible alternative to firefly luciferase. *Cell transplantation*.
21. **Bradley, J.A., Bolton, E.M., Pedersen, R.A.**, 2002. Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2:859–871.
22. **Budde, M.D., Frank, J.A.**, 2009. Magnetic tagging of therapeutic cells for MRI. *J Nucl Med* February 2009 vol. 50 no. 2 171-174.
23. **Bühnemann, C., Scholz, A., Bernreuther, C., Malik, C.Y., Braun, H., Schachner, M., Reymann, K.G., Dihné, M.**, 2006. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain.* 129:3238–3248.
24. **Buta, C., David, R., Dressel, R., Engård, M., Fuchs, C., Gross, U., Healy, L., Hescheler, J., et al.**, 2013. Reconsidering pluripotency tests: Do we still need teratoma assays? *Stem Cell Research.* 11:552–562.
25. **Cao, F., Li, Z., Lee, A., Liu, Z., Chen, K., Wang, H., Cai, W., Chen, X., Wu, J.C.**, 2009. Noninvasive De novo Imaging of Human Embryonic Stem Cell-Derived Teratoma Formation. *Cancer Research.* 69:2709–2713.
26. **Castro, C.A., Ben-Yehudah, A., Ozolek, J.A., Mills, P.H., Redinger, C.J., Mich-Basso, J.D., McFarland, D.A., Oliver, S.L., Ahrens, E.T., Schatten, G.**, 2010. Semiquantitative histopathology and 3D magnetic resonance microscopy as collaborative platforms for tissue identification and comparison within teratomas derived from pedigreed primate embryonic stem cells. *Stem Cell Research.* 5:201–211.
27. **Chatziioannou, A.F.**, 2005. Instrumentation for molecular imaging in pre-clinical research: Micro-PET and Micro-SPECT. *Proceedings of the American Thoracic Society.* 2:533-6, 510-11.
28. **Chen, E.Q., MacIntyre, W.J., Go, R.T., Brunken, R.C., Saha, G.B., Wong, C.Y., Neumann, D.R., Cook, S.A., Khandekar, S.P.**, 1997. Myocardial viability studies using fluorine-18-FDG SPECT: a comparison with fluorine-18-FDG

PET. *Journal of nuclear medicine* : official publication, Society of Nuclear Medicine. 38:582–586.

29. **Chen, L., Qiu, R., Xu, Q.**, 2014. Stem cell therapy for ischemic stroke. *J Nanosci Nanotechnol.* 14:976–982.
30. **Cheng, D., Wang, Y., Liu, X., Pretorius, P.H., Liang, M., Rusckowski, M., Hnatowich, D.J.**, 2010. Comparison of <sup>18</sup>F PET and <sup>99m</sup>Tc SPECT imaging in phantoms and in tumored mice. *Bioconjugate chemistry.* 21:1565–1570.
31. **Christ, M., Louis, B., Stoeckel, F., Dieterle, A., Grave, L., Dreyer, D., Kintz, J., Ali Hadji, D., Lusky, M., Mehtali, M.**, 2000. Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Human gene therapy.* 11:415–427.
32. **Chung, J.-K.**, 2002. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *Journal of nuclear medicine* : official publication, Society of Nuclear Medicine. 43:1188–1200.
33. **Cianchetta, S., Di Bernardo, J., Romeo, G., Rhoden, K.J.**, 2010. Perchlorate transport and inhibition of the sodium iodide symporter measured with the yellow fluorescent protein variant YFP-H148Q/I152L. *Toxicology and applied pharmacology.* 243:372–380.
34. **Cynthia Fox**, 2014. World-First Embryonic Stem Cell Trial for the Heart. Abrufbar unter <http://www.biosciencetechnology.com/articles/2014/10/world-first-embryonic-stem-cell-trial-heart>. Zuletzt geprüft am 03.01.2015.
35. **Cyranoski, D.**, 2014. Next-generation stem cells cleared for human trial. *Nature*.
36. **Daadi, M.M., Li, Z., Arac, A., Grueter, B.A., Sofilos, M., Malenka, R.C., Wu, J.C., Steinberg, G.K.**, 2009. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 17:1282–1291.
37. **Daadi, M.M., Maag, A.-L., Steinberg, G.K.**, 2008. Adherent self-renewable human embryonic stem cell-derived neural stem cell line: functional engraftment in experimental stroke model. *PLoS ONE.* 3:e1644.

38. **Dai, G., Levy, O., Carrasco, N.**, 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*. 379:458–460.
39. **Damjanov, I.**, 2004. From stem cells to germ cell tumors and back. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*. 88:39–44.
40. **Das, B.K.** Positron emission tomography. A guide for clinicians ISBN: 978-81-322-2097-8.
41. **David, R., Jarsch, V.B., Schwarz, F., Nathan, P., Gegg, M., Lickert, H., Franz, W.-M.**, 2011. Induction of MesP1 by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovascular Research*. 92:115–122.
42. **Dirac, P. A. M.**, 1928. The Quantum Theory of the Electron. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*.
43. **Dohán, O., De la Vieja, Antonio, Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C.S., Carrasco, N.**, 2003. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 24:48–77.
44. **Draper, J.S., Pigott, C., Thomson, J.A., Andrews, P.W.**, 2002. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* 200:249–258.
45. **Dressel, R., Schindehütte, J., Kuhlmann, T., Elsner, L., Novota, P., Baier, P.C., Schillert, A., Bickeböller, H., et al.**, 2008. The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PloS one*. 3:e2622.
46. **Evans, M.J., Kaufman, M.H.**, 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 292:154–156.
47. **Ferreira, L., Karp, J.M., Nobre, L., Langer, R.**, 2008. New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. *Cell Stem Cell*. 3:136–146.
48. **Fischer, B.M., Olsen, Minna W B, Ley, C.D., Klausen, T.L., Mortensen, J., Højgaard, L., Kristjansen, Paul E G**, 2006. How few cancer cells can be detected by positron emission tomography? A frequent question addressed by an

in vitro study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 33:697–702.

49. **Fisher, S.A., Brunskill, S.J., Doree, C., Mathur, A., Taggart, D.P., Martin-Rendon, E.**, 2014. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database Syst Rev*. 4:CD007888.
50. **Flynn, A., O'Brien, T.**, 2011. Stem cell therapy for cardiac disease. *Expert Opin Biol Ther*. 11:177–187.
51. **Frantz, S.**, 2012. Embryonic stem cell pioneer Geron exits field, cuts losses. *Nat. Biotechnol*. 30:12–13.
52. **Freudenberg, L.S., Jentzen, W., Stahl, A., Bockisch, A., Rosenbaum-Krumme, S.J.**, 2011. Clinical applications of 124I-PET/CT in patients with differentiated thyroid cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 38 Suppl 1:S48-56.
53. **Fu, X.**, 2014. The immunogenicity of cells derived from induced pluripotent stem cells. *Cellular & molecular immunology*. 11:14–16.
54. **Fujikawa, T., Oh, S.-H., Pi, L., Hatch, H.M., Shupe, T., Petersen, B.E.**, 2005. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am. J. Pathol*. 166:1781–1791.
55. **Furukawa, T., Lohith, T.G., Takamatsu, S., Mori, T., Tanaka, T., Fujibayashi, Y.**, 2006. Potential of the FES-hERL PET reporter gene system -- basic evaluation for gene therapy monitoring. *Nuclear medicine and biology*. 33:145–151.
56. **Gambhir, S.S., Barrio, J.R., Phelps, M.E., Iyer, M., Namavari, M., Satyamurthy, N., Wu, L., Green, L.A., et al.**, 1999. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:2333–2338.
57. **Garbern, J.C., Lee, R.T.**, 2013. Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration. *Cell Stem Cell*. 12:689–698.

58. **Gepstein, L.**, 2002. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circulation Research*. 91:866–876.
59. **Gershlick, A.H., Banning, A.P., Myat, A., Verheugt, Freek W A, Gersh, B.J.**, 2013. Reperfusion therapy for STEMI: is there still a role for thrombolysis in the era of primary percutaneous coronary intervention? *Lancet*. 382:624–632.
60. **Gonfiotti, A., Jaus, M.O., Barale, D., Baiguera, S., Comin, C., Lavorini, F., Fontana, G., Sibila, O., et al.**, 2014. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet*. 383:238–244.
61. **Gregory, R.A., Hooker, C.A., Partridge, M., Flux, G.D.**, 2009. Optimization and assessment of quantitative 124I imaging on a Philips Gemini dual GS PET/CT system. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 36:1037–1048.
62. **Groebner, M., David, R., Franz, W.M.**, 2006. Embryonale Stammzellen. *Internist*. 47:502–508.
63. **Haacke, E.M.**, ©1999. Magnetic resonance imaging. Physical principles and sequence design ISBN:0-471-35128-8. Wiley. New York.
64. **Harkany, T., Andäng, M., Kingma, H.J., Göröcs, T.J., Holmgren, C.D., Zilberter, Y., Ernfors, P.**, 2004. Region-specific generation of functional neurons from naive embryonic stem cells in adult brain. *Journal of neurochemistry*. 88:1229–1239.
65. **Higuchi, T., Anton, M., Dumler, K., Seidl, S., Pelisek, J., Saraste, A., Welling, A., Hofmann, F., et al.**, 2009. Combined Reporter Gene PET and Iron Oxide MRI for Monitoring Survival and Localization of Transplanted Cells in the Rat Heart. *Journal of Nuclear Medicine*. 50:1088–1094.
66. **Hima Bindu A, Srilatha B**, 2011. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 115 (2011).
67. **Holditch, S.J., Terzic, A., Ikeda, Y.**, 2014. Concise Review: Pluripotent Stem Cell-Based Regenerative Applications for Failing beta-Cell Function. *Stem Cells Transl Med*. 3:653–661.



68. **Hong, H., Yang, Y., Zhang, Y., Cai, W.,** 2010. Non-invasive imaging of human embryonic stem cells. *Curr Pharm Biotechnol.* *11*:685–692.
69. **Ian Murnaghan.** Overview of Stem Cell Therapy. Abrufbar unter <http://www.explorestemcells.co.uk/overviewstemcelltherapy.html>. Zulezt geprüft am 05.04.2015.
70. **Imura, H., Katakura, J., Kitao, K., Tamura, T.,** 1997. Nuclear Data Sheets for A ;eq 124. *Nuclear Data Sheets.* *80*:895–1068.
71. **Irion, S., Luche, H., Gadue, P., Fehling, H.J., Kennedy, M., Keller, G.,** 2007. Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nature biotechnology.* *25*:1477–1482.
72. **Joggerst, S.J., Hatzopoulos, A.K.,** 2009. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev. Mol. Med.* *11*.
73. **Johnson, M., Karanikolas, Breanne D W, Priceman, S.J., Powell, R., Black, M.E., Wu, H.-M., Czernin, J., Huang, S.-C., Wu, L.,** 2009. Titration of variant HSV1-tk gene expression to determine the sensitivity of 18F-FHBG PET imaging in a prostate tumor. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* *50*:757–764.
74. **Kang, J.H., Chung, J.-K.,** 2008. Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* *49 Suppl 2*:164S-79S.
75. **Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., Gepstein, L.,** 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* *108*:407–414.
76. **Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araúzo-Bravo, M.J., Ruau, D., et al.,** 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* *454*:646–650.
77. **Kleinsmith, L.J. et al.,** 1964. MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Research.*

78. **Klutz, K., Russ, V., Willhauck, M.J., Wunderlich, N., Zach, C., Gildehaus, F.J., Goke, B., Wagner, E., Ogris, M., Spitzweg, C.,** 2009. Targeted Radioiodine Therapy of Neuroblastoma Tumors following Systemic Nonviral Delivery of the Sodium Iodide Symporter Gene. *Clinical Cancer Research*. 15:6079–6086.
79. **Knesaurek, K., Machac, J.,** 2006. Comparison of <sup>18</sup>F SPECT with PET in myocardial imaging: a realistic thorax-cardiac phantom study. *BMC nuclear medicine*. 6:5.
80. **Knoepffler, N., Schipanski, D., Sorgner, S.L.,** 2007. Humanbiotechnology as social challenge. An interdisciplinary introduction to bioethics ISBN: 978-0-7546-5755-2. Ashgate. Aldershot, England, Burlington, VT.
81. **Knoepfler, P.S.,** 2009. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*. 27:1050–1056.
82. **Koehler, L., Gagnon, K., McQuarrie, S., Wuest, F.,** 2010. Iodine-124: a promising positron emitter for organic PET chemistry. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 15:2686–2718.
83. **Kooreman, N.G., Wu, J.C.,** 2010. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging. *Journal of The Royal Society Interface*. 7:S753.
84. **Kraitchman, D.L., Heldman, A.W., Atalar, E., Amado, L.C., Martin, B.J., Pittenger, M.F., Hare, J.M., Bulte, Jeff W M,** 2003. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation*. 107:2290–2293.
85. **Kurosawa, H.,** 2007. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering*. 103:389–398.
86. **Laflamme, M.A., Murry, C.E.,** 2011. Heart regeneration. *Nature*. 473:326–335.
87. **Lang, C., Lehner, S., Todica, A., Boening, G., Franz, W.-M., Bartenstein, P., Hacker, M., David, R.,** 2013. Positron emission tomography based in-vivo imaging of early phase stem cell retention after intramyocardial delivery in the

mouse model. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 40:1730–1738.

88. **Lee, A.S., Tang, C., Cao, F., Xie, X., van der Bogt, Koen, Hwang, A., Connolly, A.J., Robbins, R.C., Wu, J.C.,** 2009. Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle*. 8:2608–2612.
89. **Lee, A.S., Tang, C., Rao, M.S., Weissman, I.L., Wu, J.C.,** 2013. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature medicine*. 19:998–1004.
90. **Leiden, J.M.,** 1996. Adenovirus-Mediated Gene Transfer as an In Vivo Probe of Lipoprotein Metabolism. *Circulation*. 94:2046–2051.
91. **Lennard, A.L., Jackson, G.H.,** 2000. Stem cell transplantation. *BMJ*. 321:433–437.
92. **Lu, X., Zhao, T.,** 2013. Clinical therapy using iPSCs: hopes and challenges. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 11:294–298.
93. **Lubberink, M., Herzog, H.,** 2011. Quantitative imaging of 124I and 86Y with PET. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 38 Suppl 1:S10-8.
94. **Lukovic, D., Stojkovic, M., Moreno-Manzano, V., Bhattacharya, S.S., Erceg, S.,** 2014. Perspectives and Future Directions of Human Pluripotent Stem Cell-Based Therapies: Lessons from Geron's Clinical Trial for Spinal Cord Injury. *Stem Cells and Development*. 23:1–4.
95. **Mathiasen, A.B.,** 2013. Non-invasive In-Vivo Imaging of Stem Cells after Transplantation in Cardiovascular Tissue. *Theranostics*. 3:561–572.
96. **Mengarelli, I., Fryga, A., Barberi, T.,** 2013. Use of Multicolor Flow Cytometry for Isolation of Specific Cell Populations Deriving from Differentiated Human Embryonic Stem Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*.
97. **Miriam Falco.** FDA approves human embryonic stem cell study. Abrufbar unter <http://edition.cnn.com/2009/HEALTH/01/23/stem.cell/>. Zuletzt geprüft am 05.04.2015.

98. **Mitalipov, S., Wolf, D.**, 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *114*:185–199.
99. **Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J.**, 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* *88*:287–298.
100. **Mueller, D., Shambloott, M.J., Fox, H.E., Gearhart, J.D., Martin, L.J.**, 2005. Transplanted human embryonic germ cell-derived neural stem cells replace neurons and oligodendrocytes in the forebrain of neonatal mice with excitotoxic brain damage.
101. **Muir, K., Kalladka, D.**, 2014. Brain repair: cell therapy in stroke. *SCCAA*:31.
102. **MÜLLER, M.**, 2000. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *The FASEB Journal.* *14*:2540–2548.
103. **Murakami, T., Sunada, Y.**, 2011. Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. *Current gene therapy.* *11*:447–456.
104. **Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S.**, 2007. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.
105. **Nikhil Swaminathan.** Stem Cells—This Time without the Cancer. Abrufbar unter <http://www.scientificamerican.com/article/stem-cells-without-cancer/>. Zuletzt geprüft am 05.04.2015.
106. **Nir, S.**, 2003. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. *Cardiovascular Research.* *58*:313–323.
107. **Norrving, B., Kissela, B.**, 2013. The global burden of stroke and need for a continuum of care. *Neurology.* *80*:S5-12.
108. **Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S.**, 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* *448*:313–317.
109. **Ollinger, J.M., Fessler, J.A.**, 1997. Positron-emission tomography. *IEEE Signal Process. Mag.* *14*:43–55.

110. **Pearl, J., Wu, J.C.**, 2008. Seeing is believing: tracking cells to determine the effects of cell transplantation. Seminars in thoracic and cardiovascular surgery. *20*:102–109.
111. **Pentlow, K.S., Graham, M.C., Lambrecht, R.M., Daghighian, F., Bacharach, S.L., Bendriem, B., Finn, R.D., Jordan, K., et al.**, 1996. Quantitative imaging of iodine-124 with PET. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. *37*:1557–1562.
112. **Phelps, M.E., Hoffman, E.J., Mullani, N.A., Ter-Pogossian, M.M.**, 1975. Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. *16*:210–224.
113. **Philippe Menasché, Albert A Hagège**, 2014. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-derived Progenitors in Severe Heart Failure (ESCORT). Abrufbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02057900>. Zuletzt geprüft am 03.01.2015.
114. **Pomper, M.G., Hammond, H., Yu, X., Ye, Z., Foss, C.A., Lin, D.D., Fox, J.J., Cheng, L.**, 2009. Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models. Cell Res. *19*:370–379.
115. **Positron Emission Tomography (PET)**. Abrufbar unter <http://bme.ucdavis.edu/cmgi/imaging-modalities/positron-emission-tomography-pet/>. Zuletzt geprüft am 05.04.2015.
116. **Positronenemissionstomographie**. Abrufbar unter <http://de.wikipedia.org/wiki/Positronen-Emissions-Tomographie>. Zuletzt geprüft am 26.12.2014.
117. **Potten, C.S., Loeffler, M.**, 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development. *110*:1001–1020.
118. **Prokhorova, T.A., Harkness, L.M., Frandsen, U., Ditzel, N., Schröder, H.D., Burns, J.S., Kassem, M.**, 2009. Teratoma Formation by Human Embryonic Stem Cells Is Site Dependent and Enhanced by the Presence of Matrigel. Stem Cells and Development. *18*:47–54.

119. **Puliafico, S.B., Penn, M.S., Silver, K.H.**, 2013. Stem Cell Therapy for Heart Disease. J GEN INTERN MED.
120. **RD Badawi**, 1998. Aspects of Optimisation and Quantification in Three Dimensional Positron Emission Tomography. Abrufbar unter [http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet\\_intro/toc.html](http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet_intro/toc.html) und <https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/files/2935339/286313.pdf>. Zuletzt geprüft am 26.12.2014.
121. **Regenerative medicine glossary**, 2009. Abrufbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604041>. Zuletzt geprüft am 03.01.2015.
122. **Reinders, A A T S, Paans, A M J, de Jong, B M, den Boer, J A, Willemssen, A T M**, 2002. Iterative versus filtered backprojection reconstruction for statistical parametric mapping of PET activation measurements: a comparative case study. *NeuroImage* 15; 175-181.
123. **Rha, J.-H., Saver, J.L.**, 2007. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 38:967–973.
124. **Riess, P., Molcanyi, M., Bentz, K., Maegele, M., Simanski, C., Carlitscheck, C., Schneider, A., Hescheler, J., et al.**, 2007. Embryonic Stem Cell Transplantation after Experimental Traumatic Brain Injury Dramatically Improves Neurological Outcome, But May Cause Tumors. *Journal of Neurotrauma.* 24:216–225.
125. **Ritt, P., Vija, H., Horneegger, J., Kuwert, T.**, 2011. Absolute quantification in SPECT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 38 Suppl 1:S69-77.
126. **Rodriguez-Porcel, M.**, 2010. In vivo imaging and monitoring of transplanted stem cells: clinical applications. *Current cardiology reports.* 12:51–58.
127. **Rong, Z., Fu, X., Wang, M., Xu, Y.**, 2012. A scalable approach to prevent teratoma formation of human embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry.* 287:32338–32345.
128. **Scholz, I.V., Cengic, N., Baker, C.H., Harrington, K.J., Maletz, K., Bergert, E.R., Vile, R., Göke, B., Morris, J.C., Spitzweg, C.**, 2004. Radioiodine

therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer. *Gene Ther.* 12:272–280.

129. **Schwartz, S.D., Hubschman, J.-P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., Lanza, R.,** 2012. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet.* 379:713–720.
130. **Scully, T.,** 2012. Diabetes in numbers. *Nature.* 485:S2-3.
131. **Selvaraj, V., Plane, J.M., Williams, A.J., Deng, W.,** 2010. Switching cell fate: the remarkable rise of induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming technologies. *Trends in biotechnology.* 28:214–223.
132. **Shanthly, N., Aruva, M.R., Zhang, K., Mathew, B., Thakur, M.L.,** 2006. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of Radiopharmaceutical Chemistry and Biology.* 50:205–216.
133. **Sheryl Gay Stolberg.** The Biotech Death of Jesse Gelsinger. Abrufbar unter <http://www.nytimes.com/1999/11/28/magazine/the-biotech-death-of-jesse-gelsinger.html>. Zulezt geprüft am 06.04.2015.
134. **Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W.-Z., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., Palpant, N.J., Gantz, J., et al.,** 2012. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature.* 489:322–325.
135. **Smanik, P.A., Liu, Q., Furminger, T.L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferri, E.L., Jhiang, S.M.,** 1996. Cloning of the human sodium iodide symporter.
136. **Sokolov, M.V., Neumann, R.D.,** 2012. Human embryonic stem cell responses to ionizing radiation exposures: current state of knowledge and future challenges. *Stem cells international.* 2012:579104.
137. **Solanas, G., Benitah, S.A.,** 2013. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14:737–748.

138. **Sperger, J.M., Chen, X., Draper, J.S., Antosiewicz, J.E., Chon, C.H., Jones, S.B., Brooks, J.D., Andrews, P.W., Brown, P.O., Thomson, J.A.,** 2003. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*:13350–13355.
139. **Spitzweg, C., Baker, C.H., Bergert, E.R., O'Connor, M.K., Morris, J.C.,** 2007. Image-guided radioiodide therapy of medullary thyroid cancer after carcinoembryonic antigen promoter-targeted sodium iodide symporter gene expression. *Human gene therapy.* *18*:916–924.
140. **Spitzweg, C., Scholz, I.V., Bergert, E.R., Tindall, D.J., Young, C Y F, Göke, B., Morris, J.C.,** 2003. Retinoic acid-induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer cells. *Endocrinology.* *144*:3423–3432.
141. **Spitzweg, C., Zhang, S., Bergert, E.R., Castro, M.R., McIver, B., Heufelder, A.E., Tindall, D.J., Young, C.Y., Morris, J.C.,** 1999. Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* *59*:2136–2141.
142. **Standke, R.,** 2002. Technische Grundlagen der 18F-Fluorodeoxyglukose-Positronen-emissionstomographie-Diagnostik. *Acta Med Austriaca.* *29*:149–155.
143. **Su, W., Zhou, M., Zheng, Y., Fan, Y., Wang, L., Han, Z., Kong, D., Zhao, R.C., et al.,** 2011. Bioluminescence reporter gene imaging characterize human embryonic stem cell-derived teratoma formation. *J. Cell. Biochem.* *112*:840–848.
144. **Swijnenburg, R.-J., Tanaka, M., Vogel, H., Baker, J., Kofidis, T., Gunawan, F., Lebl, D.R., Caffarelli, A.D., et al.,** 2005. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation.* *112*:166-72.
145. **Sydooff, M., Uusijärvi, H., Leide-Svegborn, S., Mattsson, S.,** 2010. Absolute quantification of activity content from PET images using the Philips Gemini TF PET/CT system. *Radiation protection dosimetry.* *139*:236–239.



146. **Takahashi, K., Yamanaka, S.**, 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126:663–676.
147. **Templin, C., Zweigerdt, R., Schwanke, K., Olmer, R., Ghadri, J.-R., Emmert, M.Y., Muller, E., Kuest, S.M., et al.**, 2012. Transplantation and Tracking of Human-Induced Pluripotent Stem Cells in a Pig Model of Myocardial Infarction: Assessment of Cell Survival, Engraftment, and Distribution by Hybrid Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography of Sodium Iodide Symporter Transgene Expression. *Circulation*. 126:430–439.
148. **Ter-Pogossian, M.M., Phelps, M.E., Hoffman, E.J., Mullani, N.A.**, 1975. A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). *Radiology*. 114:89–98.
149. **Terrovitis, J., Kwok, K.F., Lautamäki, R., Engles, J.M., Barth, A.S., Kizana, E., Miake, J., Leppo, M.K., et al.**, 2008. Ectopic Expression of the Sodium-Iodide Symporter Enables Imaging of Transplanted Cardiac Stem Cells In Vivo by Single-Photon Emission Computed Tomography or Positron Emission Tomography. *Journal of the American College of Cardiology*. 52:1652–1660.
150. **Terrovitis, J., Stuber, M., Youssef, A., Preece, S., Leppo, M., Kizana, E., Schär, M., Gerstenblith, G., et al.**, 2008. Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart. *Circulation*. 117:1555–1562.
151. **Terrovitis, J.V., Smith, R.R., Marban, E.**, 2010. Assessment and Optimization of Cell Engraftment After Transplantation Into the Heart. *Circulation Research*. 106:479–494.
152. **Thomas, E.D.**, 1999. Bone marrow transplantation: a review. *Seminars in hematology*. 36:95–103.
153. **Thomson, J.A.**, 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 282:1145–1147.

154. **Tjuvajev, J.G., Stockhammer, G., Desai, R., Uehara, H., Watanabe, K., Gansbacher, B., Blasberg, R.G.**, 1995. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Research*. *55*:6126–6132.
155. **Tohyama, S., Hattori, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., et al.**, 2013. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*. *12*:127–137.
156. **Townsend, D.W.**, 2008. Combined positron emission tomography-computed tomography: the historical perspective. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*. *29*:232–235.
157. **van Sande, J., Massart, C., Beauwens, R., Schoutens, A., Costagliola, S., Dumont, J.E., Wolff, J.**, 2003. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology*. *144*:247–252.
158. **Visser, E.P., Disselhorst, J.A., Brom, M., Laverman, P., Gotthardt, M., Oyen, Wim J G, Boerman, O.C.**, 2009. Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. *50*:139–147.
159. **Vos, A., Neubert, A., Pommerening, E., Müller, T., Döhner, L., Neubert, L., Hughes, K.**, 2001. Immunogenicity of an E1-deleted recombinant human adenovirus against rabies by different routes of administration. *The Journal of general virology*. *82*:2191–2197.
160. **Wang, C.X., Snyder, W.E., Bilbro, G., Santago, P.**, 1998. Performance evaluation of filtered backprojection reconstruction and iterative reconstruction methods for PET images. *Computers in biology and medicine*. *28*:13-24; discussion 24-5.
161. **Wang, W.E., Chen, X., Houser, S.R., Zeng, C.**, 2013. Potential of cardiac stem/progenitor cells and induced pluripotent stem cells for cardiac repair in ischemic heart disease. *Clin. Sci*. *125*:319–327.
162. **Wang, Y.-X.J.**, 2011. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative imaging in medicine and surgery*. *1*:35–40.

163. **Weiss, S.J., Philp, N.J., Grollman, E.F.**, 1984. Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology*. 114:1090–1098.
164. **Wells, R.G., King, M.A., Simkin, P.H., Judy, P.F., Brill, A.B., Gifford, H.C., Licho, R., Pretorius, P.H., Schneider, P.B., Seldin, D.W.**, 2000. Comparing filtered backprojection and ordered-subsets expectation maximization for small-lesion detection and localization in 67Ga SPECT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 41:1391–1399.
165. **Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., Jaenisch, R.**, 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 448:318–324.
166. **Wilson, K.D., Huang, M., Wu, J.C.**, 2009. Bioluminescence reporter gene imaging of human embryonic stem cell survival, proliferation, and fate. *Methods Mol Biol*. 574:87–103.
167. **Wood, K.J., Fry, J.** Gene therapy: potential applications in clinical transplantation. *ERM*. 11 (1999).
168. **Woods, D.H., Woods, S.A., Woods, M.J., Makepeace, J.L., Downey, C., Smith, D., Munster, A.S., Lucas, S., Sharma, H.**, 1992. The standardization and measurement of decay scheme data of 124I. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*. 43:551–560.
169. **Wu, J.C., Cao, F., Dutta, S., Xie, X., Kim, E., Chungfat, N., Gambhir, S., Mathewson, S., et al.**, 2006. Proteomic analysis of reporter genes for molecular imaging of transplanted embryonic stem cells. *Proteomics*. 6:6234–6249.
170. **Wu, J.C., Spin, J.M., Cao, F., Lin, S., Xie, X., Gheysens, O., Chen, I.Y., Sheikh, A.Y., et al.**, 2006. Transcriptional profiling of reporter genes used for molecular imaging of embryonic stem cell transplantation. *Physiological genomics*. 25:29–38.
171. **Xue, T., Cho, H.C., Akar, F.G., Tsang, S.-Y., Jones, S.P., Marbán, E., Tomaselli, G.F., Li, R.A.**, 2005. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells

with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation*. 111:11–20.

172. **Yaghoubi, S.S., Campbell, D.O., Radu, C.G., Czernin, J.**, 2012. Positron emission tomography reporter genes and reporter probes: gene and cell therapy applications. *Theranostics*. 2:374–391.
173. **Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., et al.**, 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 4:381–384.

## **8 VERBINDLICHKEITEN**

Der Autor der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit bestätigt, dass keine Verbindlichkeiten, finanzielle Interessen oder sonstige Interessenskonflikte vorliegen.

Aus der vorliegenden Arbeit entsprang die Publikation „<sup>124</sup>I-PET-Assessment of Human Sodium-Iodine Symporter Reporter Gene Activity for Highly Sensitive In-vivo Monitoring of Teratoma Formation in Mice, welche zum Zeitpunkt der Fertigstellung zur Publikation in „Molecular Imaging and Biology“ angenommen war.

Diese Arbeit wurde vom FöFoLe-Programm der LMU München, dem BMBF sowie der DFG unterstützt.

## **9 DANKSAGUNG**

Viele ausgezeichnete Wissenschaftler und bemerkenswerte Menschen haben während der langjährigen, intensiven Arbeit an diesem Projekt ihren unschätzbaren Beitrag geleistet. Ohne sie wäre ein Projekt wie dieses niemals durchführbar gewesen.

Zunächst möchte ich den Professoren Dr. med. Marcus Hacker und Dr. rer. nat. Robert David danken. Sie setzten die Grundsteine für dieses Projekt. Ohne ihren Ansporn und ihre Ermutigung wäre die vorliegende Arbeit nie zustande gekommen.

Meinem geschätzten Mentor und geachteten Freund, dem hervorragenden Wissenschaftler Dr. med. Sebastian Lehner gilt mein unendlicher Dank. Seine unermüdliche Sorgfalt, sein Fleiß, sein nie vom Ziel abschweifender Blick fürs Detail und seine unerschöpfliche Positivität und Zielstrebigkeit waren es, die mich die letzten Jahre immer wieder motivierten, trotz der Belastungen des Medizinstudiums und des Assistentenarztdaseins, dieses Projekt, teils im Morgengrauen, teils in der späten Nacht zum Abschluss zu bringen.

Dem geschätzten wissenschaftlichen, veterinärmedizinischen und Hilfspersonal der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin sowie der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik am Klinikum Großhadern danke ich für die fachkundige Unterstützung. Sie brachten mir mit Geduld und Sorgfalt alle wichtigen Fertigkeiten bei und leisteten mit ihrer Expertise einen ausschlaggebenden Beitrag zum Gelingen der Versuche. Mein Dank

geht insbesondere an Christiane Groß, Barbara Markieton, Judith Arcifa, Dr. med. vet. Janette Carlsen und Dr. med. vet. Roswitha Beck.

Mein Dank geht auch an das FöFoLe-Programm der LMU München dafür, dass es sowohl ideell als auch materiell die Durchführung dieser Forschungsarbeit unterstützte.

Meinen Eltern, Prof. Dr. jur. Athanassios Kaissis und Dr. phil. Christine Stephan-Kaissis, denen dieses Werk gewidmet ist, gilt mein liebevoller Dank. Ohne sie stünde ich heute nicht an dieser Stelle.

München, im April 2015

Georgios Kaissis

# Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand